

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 867 114 A1

(12)

# EUROPEAN PATENT APPLICATION

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

30.09.1998 Bulletin 1998/40

(21) Application number: 96932037.3

(22) Date of filing: 27.09.1996

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: A01K 67/027

(86) International application number:

PCT/JP96/02828

(87) International publication number:

WO 97/11597 (03.04.1997 Gazette 1997/15)

(84) Designated Contracting States:

AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE

(30) Priority: 29.09.1995 JP 275110/95

(71) Applicants:

- Hoechst Marion Roussel, Ltd.  
Tokyo 107-8465 (JP)
- Ogawa, Shyoso  
Tokyo 156 (JP)
- Iwaya, Makoto  
Tokyo 154 (JP)

(72) Inventors:

- OGAWA, Shyoso  
Tokyo 156 (JP)
- IWAYA, Makoto  
Tokyo 154 (JP)
- SATOH, Masahiro  
Kanagawa 259-11 (JP)
- TADA, Norihiro  
Saitama 336 (JP)

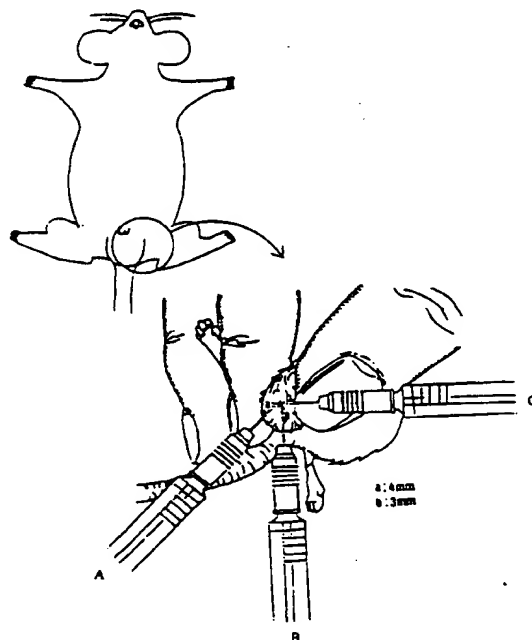
(74) Representative:

Macchetta, Francesco et al  
GRUPPO LEPETIT S.p.A.  
Patent and Trademark Department  
Viale Gran Sasso, 18  
20131 Milano (IT)

## (54) METHOD FOR PREPARING TRANSGENIC ANIMAL

(57) A method for preparing a sperm containing an exogenous DNA, wherein the exogenous DNA together with liposome for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells is injected repeating three times or more into a testis of a mature non-human vertebrate male and the sperm containing the exogenous DNA is produced in the testis of said male. It can be convenient and efficient to prepare a non-human transgenic vertebrate by mating a sperm containing an exogenous DNA with a female naturally, or mating an egg which has not yet been fertilized by artificial insemination or *in vitro* fertilization.

Fig. 2



EP 0 867 114 A1

## Description

Field of the Invention

5 The present invention relates to a convenient and efficient method for preparing transgenic animal. Specifically, the present invention relates to a method for preparing a sperm containing an exogenous DNA, wherein an exogenous DNA is injected into a testis of a mature non-human vertebrate male and then a sperm containing said exogenous DNA is produced in said testis. Moreover, the present invention relates to a method for preparing a transgenic non-human vertebrate animal, wherein said sperm containing the exogenous DNA thus obtained as described above is allowed to  
 10 fertilize with an egg of non-human vertebrate animal as described above which has not been fertilized yet.

Today transgenic animals is being applied to many fields. For example, it has become extremely important as human disease model animals for the analysis of the tissue- and stage-specificities of gene expression, analysis of the physiological function of genes, and pathological analysis and medical effective tests. The most established method for preparing such animals is a microinjection method by using a micromanipulator to inject an exogenous DNA into a pro-  
 15 nucleus of a fertilized egg (Palmiter and Brinster, *Annu. Rev. Genet.*, 20:465-499, 1986). The microinjection method is performed routinely in some laboratories, but a certain problems are encountered when it is used to prepare a transgenic animal in general. For example, microinjection of an exogenous DNA is time-consuming and the operation requires specialized skills. Microinjection requires the use of an expensive micromanipulator. Moreover, in some species of animals, the nucleus of an egg to be injected of some species cannot be seen under a microscope, so it should  
 20 be prepared by extra troublesome procedures involving centrifugation and other steps. Even after all this is done, the success rate in preparing a transgenic animal is subject to considerable variation.

On the other hand, some methods of preparing a transgenic animal without microinjection have been attempted. For example, there is a method for preparing transgenic animals in which a mouse sperm and an exogenous DNA are mixed together in a test tube and then said sperm is used to fertilize an unfertilized egg. Lavitrano *et al.* (*Cell*, 57:717-  
 25 723, 1989) reported that they had used this method successfully, but up to the present, others have not been able to duplicate their results practically (Brinster *et al.*, *Cell*, 59:239-241, 1989).

Another method attempted by Bachiller *et al.* is an improvement on the method of Lavitrano *et al.* described above, in which a mouse sperm is cultured together with a complex, comprising an exogenous DNA and liposome in order to improve the uptake of the exogenous DNA by an isolated sperm; the sperm is then used to fertilize unfertilized eggs,  
 30 but no exogenous DNA was detected in the fertilized eggs (*Mol. Reprod. Develop.*, 30:194-200, 1991). Namely, this method failed in preparing a transgenic animal. This method, although not having developed yet for a practical application, offers a certain advantage over the aforementioned microinjection method in that it does not require a special operation for microinjection nor does it require an expensive micromanipulator.

The present inventors have taken different approaches in their attempts to develop a so-called sperm-mediated gene transfer method, in which an exogenous DNA is transmitted to the egg through the agency of a sperm. For example, an exogenous DNA that has been precipitated by calcium phosphate is injected through a syringe directly into testes of a male animal (Sato *et al.*, *Animal Biotech.*, 5:19-31, 1994). The testes contain sperm cells in many different stages of differentiation, ranging from undifferentiated spermatogonia (which are the undifferentiated precursor for spermatozoa) through the spermatocytes, which are in the process of differentiation, to the testicular spermatozoa,  
 40 which are even more differentiated. Testicular spermatozoa do not exhibit the vigorous motility characteristic of a sperm, but as they are transported through the epididymis they begin to exhibit this activity. Generally, an exogenous DNA that has been precipitated by calcium phosphate is readily taken up by cultured mammalian cells when the two are cultured together. It is known that phenotypical transformation may occur as a result of this process (Wigler *et al.*, *Cell*, 11:223-232, 1977). It is thus conceivable that the injection of a calcium phosphate-precipitated exogenous DNA  
 45 into a testis could induce phenotypical transformation of a testicular spermatozoa through the introduction of the exogenous DNA. Then, by releasing the phenotypically transformed sperm (containing the exogenous DNA) to fertilize eggs in the oviduct of a female animal, it is conceivable that the exogenous DNA will be transmitted to the chromosomes of the fertilized egg. Thus, a transgenic fertilized egg will be prepared. If this method succeeds in the preparation of transgenic animals, it will be possible to introduce an exogenous DNA into 100,000 sperm cells or more at once, providing  
 50 a far more practical method than the difficult procedure of microinjection of an exogenous DNA into fertilized eggs such as a domestic animal. In addition, the use of a sperm containing an exogenous DNA permits other advantages, such as the ability to freeze and thaw the sperm for use at a more convenient time, and lends itself to the use of artificial insemination or *in vitro* fertilization and other techniques.

Based upon this hypothesis, the present inventors experimentally injected an exogenous DNA precipitated by calcium phosphate directly into testes of male mice. As a result, the presence of the exogenous DNA in the ejaculated sperm was confirmed, but no exogenous DNA was detected in the eggs after fertilization (Sato *et al.*, *Animal Biotech.*, 5:19-31, 1994).

Detailed Description of the Invention

An object of the present invention is to provide a convenient and efficient method for preparing transgenic animals whereby a large number of transgenic animals may be prepared within a short period, but which does not require a conventional microinjection method. It is expected that, through this invention, it will be possible to solve the hitherto difficult problem of obtaining large transgenic domestic animals, such as cattle.

The present invention relates to a method for preparing an exogenous DNA together with liposome for injecting into a testis of a mature non-human vertebrate male and then producing a sperm containing said exogenous DNA in a testis of said male.

Moreover, the present invention relates to a method for preparing a transgenic non-human vertebrate animal, wherein an exogenous DNA is injected into a testis of a mature non-human vertebrate male after forming a complex with liposome for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells, and a sperm is produced in a testis of said male, and then said male is allowed to mate with a female of which egg has not been fertilized yet.

The method of this invention is characterized by mixing an exogenous DNA together with liposome for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells, and injecting it directly into a testis of a mature non-human vertebrate male.

In this specification, "exogenous DNA" refers to "plasmid DNA." The type of an exogenous DNA that is introduced can be changed in order to prepare a desired transgenic animal. Liposome, which is formed to a complex by mixing with an exogenous DNA, can be any commercially available liposome sold for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells (cationic liposome). For these liposome, liposome which contains LIPOFECTIN™ : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) and dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) at a ratio of 1:1 (w/w) is preferably used. Liposome such as TransIT™-LT1 MIR2310, TransIT™-LT2 MIR2320, TransIT™-LT100 MIR2100 (Takara Shuzo), Genetransfer 074-03621, TRANSFECTAM 561-36591 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) can be also used. Forming to a complex with an exogenous DNA and liposome is carried out according to a conventional method; for example, an exogenous DNA is added to a solution containing liposome, mixed and incubated.

A liposome-exogenous DNA complex is directly injected into a testis of mature non-human vertebrate male. The number of injection is carried out preferably three times or more. The mature males are anesthetized and the solution containing liposome described above is injected directly from the scrotum into both testes. The injection procedure is repeated at four day intervals for at least three times. On day 2 from the final injection of the liposome-exogenous DNA complex, a sperm containing the exogenous DNA is produced in the testis of said male.

A transgenic animal can be prepared by mating said males with females of whom estrus has been induced by gonadotropic hormone, making the females pregnant and delivered.

A transgenic animal can be prepared by artificial insemination or *in-vitro* fertilization using a sperm produced by the testis of a mature non-human vertebrate male that has been subjected to intratesticular injection of the exogenous DNA and by making the females pregnant and delivered.

The method of the present invention can be applied to efficiently produce non-human vertebrate animals such as experimental animals; a mouse, a rat, a rabbit, a dog, and a cat, etc. as well as domestic animals; a horse, a cattle, a pig, a goat and a sheep, etc.

A transgenic animal obtained by the method of the present invention can be raised and bred under normal conditions of animal husbandry and using ordinary animal feed.

Whether a fertilized egg or an animal obtained contains the exogenous DNA or not is confirmed by the following experiment as illustrated.

Some of the females are sacrificed on the day when copulation is confirmed (determined as the first day of pregnancy), and the intrauterine sperm and the fertilized eggs (single-cell embryos) in the oviduct are sampled. Said samples are analyzed for the presence of an exogenous DNA. The other females are allowed to live until midgestational stages through pregnancy or allowed to come to term. For those allowed to live until midgestational stages through pregnancy, the fetus is extirpated, the DNA extracted, and the rate of incorporation of an exogenous DNA in the fetal chromosome is determined by Southern blotting (Southern, *J Mol Biol.*, 98:503-517, 1975) or PCR method (Saiki *et al.*, *Science*, 239:487-491, 1988). In newborn individuals, the presence of an exogenous DNA is determined from DNA extracted from the tail on the fifth day after birth.

Mature transgenic individuals (referred to as a founder or F0 generation) are allowed to mate with normal animals to produce offspring. DNA from the second generation (F1) individuals is analyzed by Southern blotting or PCR method to determine whether an exogenous DNA has been transmitted from F0 to F3.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows a plasmid map for the plasmid pMT-neo/MT-beta-gal, used for DNA transduction.

This has the DNA sequence coding for mouse metallothionein-I promoter (MT), the gene for neomycin resistance

(neo), and the DNA sequence coding for the beta-galactosidase gene (beta-gal) downstream of the repeating DNA sequence for the mouse metallothionein-I promoter.

Explanation of symbols used in the diagram: H, *Hind*III restriction endonuclease site; E, *Eco*RI restriction endonuclease site; K, *Kpn*I restriction endonuclease site; Xh, *Xho*I restriction endonuclease site; B, *Bam*HI restriction endonuclease site; Xb, *Xba*I restriction endonuclease site; S, *Sal*I restriction endonuclease site; P, *Pst*I restriction endonuclease site; B II, *Bgl*II restriction endonuclease site; Sm, *Sma*I restriction endonuclease site; ATG, protein translation initiation site; SV pA, SV40 poly(A) addition signal site; N, *Not*I restriction endonuclease site; Cm<sup>R</sup>, gene for chloramphenicol resistance; ori, replication origin.

Fig. 2 is a schematic drawing of the operation for direct injection of the liposome-exogenous DNA complex into both testes of adult male ICR mice.

Fig. 3 shows a photograph of PCR analysis (using MI499 beta-gal and MI500 beta-gal as primers) of genomic DNA derived from an intrauterine sperm deposited by a male that had received a series of three injections of liposome-exogenous DNA complex. The symbol "m" indicates a molecular weight marker.

Figs. 4 (a) and 4 (b) present microphotographs of blastocysts fertilized by males that had received a series of three injections of liposome-exogenous DNA complex. Fig. 4 (c) is a photograph of the embryos on the thirteenth day of pregnancy. The arrow in Fig. 4 (a) points to blastocysts that do not exhibit any beta-gal enzymatic activity. The symbol "Tg" in Fig. 4 (c) indicates an embryo that has exogenous DNA and exhibits beta-gal enzymatic activity, whereas the "Non-Tg" indicates a non-transgenic embryo that does not show any beta-gal enzymatic activity.

Fig. 5 is a photograph of PCR analysis (using MI499 beta-gal and MI500 beta-gal as primers) of genomic DNA derived from blastocysts fertilized by males that had received a series of three injections of liposome-exogenous DNA complex. The symbol "m" indicates a molecular weight marker.

Fig. 6 is a photograph of PCR analysis (using MI499 beta-gal and MI500 beta-gal as primers) of genomic DNA derived from the tail of embryos on the thirteenth day of pregnancy fertilized by males that had received three injections of liposome-exogenous DNA complex. The symbol "M" indicates a molecular weight marker.

Fig. 7 shows the pedigree of descendants of Male No. 7 whose testes were injected with an exogenous DNA.

#### EXAMPLE

The following examples illustrate the method of the invention more concretely. However, it should not be construed that the invention is limited to these specific examples.

#### EXAMPLE 1 Preparation of plasmid pMT-neo/MT-beta-gal for DNA transduction

Mouse metallothionein-I promoter (MT) fragment (approximately 1.9 kb) was digested by *Eco*RI/*Bgl*II from pMGH (Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611-615, 1982), cleaved, and isolated. This was then introduced onto the *Eco*RI/*Bgl*II restriction enzyme site of plasmid pHSG396 (approx. 2.3 kb; Takeshita *et al.*, *Gene*, 71:9-18, 1988). This is referred to as pMT/1. Then a gene for neomycin resistance (approximately 1.5 kb; "neo") was isolated from plasmid pHSG294 (Brady *et al.*, *Gene*, 27:223-232, 1984) by digestion with *Bgl*II/*Hind*III restriction endonuclease and introduced onto the *Bgl*II/*Hind*III site of pMT/1 to form the vector pMT/neo-1. This vector contains the neo-expressing unit (MT-neo) where neo expression is under the control of MT. An expression unit is an assemble for expressing a gene, and normally comprises a promoter and a gene (cDNA or genomic DNA).

Separately, a beta-gal expressing unit (MT-beta-gal) of approximately 5 kb, being a fusion of MT and an *Escherichia coli*-derived beta-gal gene (approx. 3 kb, including an SV40 poly(A) addition site on the 3'-terminal), was isolated from pMT/beta-gal-1 (Sato *et al.*, *Mol. Reprod. Develop.*, 34:349-356, 1993), and this was inserted onto the *Hind*III restriction enzyme site on pMT/neo-1 (downstream MT-neo). At this time, a *Not*I linker (Boehringer Mannheim GmbH) was put on the 3'-terminal of the MT-beta-gal. The plasmid obtained by this operation was named "pMT-neo/MT-beta-gal" (approx. 10 kb; refer to Fig. 1). This plasmid contained beta-gal expressing units and neo-expressing units in a serially linked form of MT-neo and MT-beta-gal. In this example the plasmid for DNA transduction was formed by pMT-neo/MT-beta-gal, but it would also be possible to use a unit expressing a different gene of interest in place of MT-neo or MT-beta-gal.

EXAMPLE 2 Injection of the liposome-exogenous DNA (pMT-neo/MT-beta-gal) complex into the testis of male mice and extraction of an exogenous DNA from an intrauterine sperm and blastocysts obtained after coitus of said mice

The intratesticular sperms were subjected to phenotypical transformation by the injection of the liposome-exogenous DNA complex into the testis. After the sperms had been ejaculated during coitus, the intrauterine sperms and the eggs fertilized by the sperms were examined for the presence of exogenous DNA.

First, *Not*I restriction endonuclease was used to cleave plasmid pMT-neo/MT-beta-gal DNA, giving a linearized

DNA. Approximately 5 µg of the linearized DNA was mixed at a 1:1 ratio with Lipofectin™ (GIBCO-BRL, dissolved in PBS buffer, pH 7.2) at room temperature, and this was allowed to stand for 15 minutes. The manufacturer's instructions were followed for this procedure. In this process the exogenous DNA (pMT-neo/MT-beta-gal) becomes surrounded by a lipid layer of liposome and forms a so-called liposome-exogenous DNA complex. A control solution was prepared by mixing liposome at a 1:1 ratio with PBS.

The liposome-exogenous DNA complex and the control solution were each drawn up using a syringe with 1/6 gauge needle and approximately 20 µl were injected directly through the scrotum into both testes of anesthetized adult ICR male mice (age: 8-10 weeks, obtained from CLEA Japan, Inc.). A schematic drawing of the injection procedure is shown in Fig. 2. After injection of the liposome-exogenous DNA complex, the males were allowed to mate with ICR females (age: 8-10 weeks, obtained from CLEA Japan, Inc.; estrus was induced by gonadotropic hormones) at the second day after DNA injection. Then fertilized eggs (1-cell-embryos) and the intrauterine sperms were recovered from the oviduct and the uterus, respectively. The cumulus oophorus cells were removed from the recovered fertilized eggs by hyaluronidase and were then cultured for three days at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air, on 100 µl of M16 culture fluid (Whittingham, *J. Reprod. Fert.*, 14(Suppl):7-21, 1971) containing 1 µM CdCl<sub>2</sub> (for the purpose of increasing MT activity), until blastocysts had formed. Then DNA analysis by PCR method was used to determine the presence of an exogenous DNA on the cultured blastocysts. Also, some of the blastocysts were analyzed histochemically for beta-gal activity to determine if the introduced gene was being expressed. The method of Saiki *et al.* (*science*, 239:487-491, 1988) was used for DNA analysis by PCR method. At this time, two primer sets were used: the first comprised the MI499 beta-gal (SEQ ID NO.: 1) and the MI500 beta-gal (SEQ ID NO.: 2), both of which recognize the region on the 3' end of the beta-gal gene (*Molecular Cloning---A Laboratory Manual*, CSH, NY, 1982); the second comprised the MI1511 neo (SEQ ID NO.: 3) and the MI1512 neo (SEQ ID NO.: 4), both of which recognize the region on the 5' end of the neo gene (*Gene*, 19:327-336, 1982). PCR reaction conditions were as follows: 1 µl (approximately 1 µg) of genomic DNA or solution containing blastocysts was added to 9 µl of reaction mixture (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.01% (w/v) gelatin, 200 µM dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 50 pM of each of primers, and 0.1 µl of Taq polymerase), and this was reacted for 36 PCR cycles. After denaturing for one minute at 95°C, the reaction mixture was annealed at 58°C for one minute, followed by an extension reaction at 75°C for four minutes. The reaction mixture was then subjected to electrophoresis on 4% agarose gel, and the gel was stained with ethidium bromide. After staining, the presence of the amplified exogenous DNA was determined under an ultraviolet illumination.

Histochemical analysis of beta-gal was conducted as follows: specimens (blastocysts) were fixed at room temperature for five minutes in an intimate mixture of 1.25% glutaraldehyde in PBS, then washed three times in droplets of 50 µl PBS containing 0.05% bovine serum albumin (BSA). Subsequently the specimens were reacted for approximately 24 hours at 37°C in PBS (50 µl) containing 1.2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal); 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 3 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O (P3289; Sigma), and 3 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (P3667, Sigma). This operation causes blue cytoplasmic staining of specimens that exhibit beta-gal activity. No staining occurs in cytoplasm of specimens that exhibit no beta-gal activity.

The recovered intrauterine sperms were subjected to a procedure to isolate genomic DNA. The method of Sato *et al.* (*Animal Biotech*, 5:19-31, 1994) was used to isolate the genomic DNA. Specifically, the intrauterine sperms deposited by light centrifugation was placed in 700 µl lysis buffer (150 µg/ml proteinase K (No. 24568, Merck), 0.5 mg/ml Proteinase E (Kaken Kagaku Company), 100 mM NaCl, 0.4% SDS, 10 mM Tris buffer, 10 mM EDTA, pH 8.0), and allowed to be lysed at 37°C for 24-48 hours. Then 100 µl phenol was added to the lysis mixture and the supernatant was extracted. The supernatant was then treated at 37°C for 30 minutes in 80 µg/ml ribonuclease A (RNase A), thus decomposing the RNA present in the mixture. This supernatant was then treated with 700 µl of isopropanol, yielding the DNA as precipitate. The DNA precipitate was wiped up using a Gilson Yellow tip, washed in 70% ethanol, and dissolved in 70 µl of TE buffer (10 mM Tris buffer and 1 mM EDTA, pH 7). The genomic DNA derived from intrauterine sperms was subjected to PCR analysis using two different primer sets to determine the presence of exogenous DNA.

Control solution or solution containing a liposome-exogenous DNA (pMT-neo/MT-beta-gal) was injected into the testis of male animals and these mice were then mated with estrus females in the second day after DNA injection, in order to isolate fertilized eggs. Analysis of beta-gal expression was then performed using blastocysts derived from these fertilized eggs (first injection). Four days after the first injection of the liposome-exogenous DNA, the testis was injected a second time with control solution or with the liposome-exogenous DNA. Two days after the second injection of the liposome-exogenous DNA, the males were mated with estrus females. The fertilized eggs were then isolated and the genomic DNA was subjected to DNA analysis and expression analysis, as was done for the group which had received only one injection. Furthermore, four days after the second testicular injection of DNA, another injection of liposome-exogenous or control solution was performed (third injection). Generally the first injection was made from the direction labeled "A" in Fig. 2, with the syringe inserted from the surface of the scrotum to a depth of approximately 4 mm before the complex was injected. The second injection was made from direction labeled "B" in Fig. 2, with the syringe inserted from the surface of the scrotum to a depth of approximately 4 mm before the complex was injected. The third injection was made from direction labeled "C" in Fig. 2, with the syringe inserted from the surface of the scro-

turn to a depth of approximately 3 mm before the complex was injected. On the second day after the third injection of the liposome-exogenous DNA, the males were mated with estrus females. The fertilized eggs and the intrauterine sperms were then isolated, the presence exogenous DNA was determined by PCR method, and the expression of an exogenous DNA was histochemically determined for beta-gal activity. The results of these tests are shown in Table 1.

Fig. 3 shows the results of testing for the presence of an exogenous DNA in the intrauterine sperm after a full series of three injections. In Fig. 3, the first lane shows the results of PCR analysis of a genomic DNA obtained from testis on the fourth day after the third injection of the liposome-exogenous DNA complex; the band observed in this lane corresponds to that expected from the 264 bp segment derived from the exogenous DNA. The second lane shows the results of PCR analysis of a genomic DNA derived from a normal mouse; no bands are observed that could be attributed to a 264 bp segment derived from the exogenous DNA. The third lane shows the results of PCR analysis of 10 pg purified exogenous DNA (pMT-neo/MT-beta-gal); the band observed in this lane corresponds to that expected from the 264 bp segment derived from the exogenous DNA. The fourth and fifth lanes show the results of PCR analysis of the genomic DNA obtained from the intrauterine sperms released by a male on the second day after having received the third injection of a DNA-liposome complex; the bands corresponds to those expected for a 264 bp segment derived from the exogenous DNA. The samples for lanes four and five were obtained from different male mice. Figs. 4 (a) and 4 (b) show the results of histochemical analysis of beta-gal activity in blastocysts fertilized by males that had received a series of three injections. The blastocysts shown in Fig. 4 (a) were obtained by natural mating two days after the male had received the third of a series of DNA-liposome complex injections; these blastocysts were reacted in the presence of X-Gal, with the result that most were stained. The arrows point to unstained blastocysts. Fig. 4 (b) shows blastocysts that were obtained by natural mating on the second day after the male had received an injection of control solution; these blastocysts were reacted in the presence of X-Gal, but none of them were stained. Fig. 4 (c) is a photograph of the embryos on the thirteenth day of pregnancy obtained after natural mating on the second day after the male had received the third of a series of DNA-liposome complex injections; after the embryos were reacted in the presence of X-Gal, two were stained (indicated by the symbol "Tg" for "transgenic") and one was not stained (indicated by "non-Tg" for "non-transgenic").

Fig. 5 shows a photograph of PCR analysis (using MI499 beta-gal and MI500 beta-gal as the primers) of the genomic DNA derived from blastocysts fertilized by males that had received a series of three injections of the liposome-exogenous DNA complex. Lanes one and two show the results of analyzing genomic DNA derived from 10 and 5 blastocysts, respectively, that had been obtained by mating on the second day after the male had received the third of a series of DNA-liposome complex injections; a band is observed which corresponds to that predicted for the 264 bp segment derived from exogenous DNA. Lane three shows the results of PCR analysis of the genomic DNA from 10 blastocysts obtained from a normal mouse; in this case no bands are observed that would result from a 264 bp segment of the exogenous DNA. The results are summarized below.

(1) The presence of the exogenous DNA was observed in the intrauterine sperms obtained after natural mating of a female with a male who had received intratesticular injection of liposome-exogenous DNA complex.

(2) The presence of the exogenous DNA was observed in blastocysts derived from fertilized ova obtained after natural mating of a female with a male who had received intratesticular injection of liposome-exogenous DNA complex. This suggests that the exogenous DNA introduced into the testis was transmitted *via* the sperms to the ova.

(3) The presence of the exogenous DNA in the blastocysts was demonstrated by histochemical analysis for beta-gal activity. Specifically, as the number of intratesticular injections of liposome-exogenous DNA complex increased, the proportion of blastocysts expressing beta-gal activity also increased.

EXAMPLE 3 The detection of the exogenous DNA in the embryo (F0) obtained from matings that occur two days after intratesticular injection of liposome-exogenous DNA complex

This experiment was tested whether the exogenous DNA would still be present in embryos (on the thirteenth day of pregnancy) derived from eggs fertilized by sperms that had been subjected to phenotypical transformation by injection of liposome-exogenous DNA complex into the testis.

Male ICR mice that had received a series of three injections of control solution or liposome-exogenous DNA complex were mated with estrus female ICR mice (8-10 weeks old; estrus was induced by gonadotropic hormones). On the thirteenth day of pregnancy, corresponding to a midgestational stage, the embryos were extracted from the womb and genomic DNA was sampled from the tails. The genomic DNA was analyzed by PCR method described in Example 2. The results are shown in Table 2 and Fig. 6. In Fig. 6, no formation of a band predicted by the 264 bp size of the exogenous DNA was observed in lanes 1, 2, 4, 6, and 8, which are accordingly interpreted as non-transgenic. The formation of a band predicted by the 264 bp size of the exogenous DNA was observed in lanes 3, 5, 7, 9, and 10, which are accordingly interpreted as transgenic. The formation of a band predicted by the 264 bp size of the exogenous DNA was

not observed in lane C, which shows the results of PCR analysis of genomic DNA from the tail of a normal mouse. The results are summarized below.

(1) The presence of the exogenous DNA was determined in PCR analysis of genomic DNA in 4 out of 14 embryos (28.6%) that were examined in the experimental group. These results are similar to the results of PCR analysis using primer sets that recognize the neo gene.

(2) Out of 53 embryos examined in the experimental group, 18 (34.0%) were determined to show beta-gal activity.

(3) No exogenous DNA was present in any out of 10 embryos examined in the control group. Nor did any out of 21 embryos in the control group examined for beta-gal activity exhibit such activity.

These results demonstrate that the invented method successfully yielded transgenic embryos that had conserved the exogenous DNA.

**EXAMPLE 4** Transmission of the exogenous DNA to the successor generation (F1) from the transgenic individual (F0) sired by a male subjected as an adult to intratesticular injection of liposome-exogenous DNA complex

Since it had been confirmed that the exogenous DNA was present in individuals grown from ova fertilized by sperms that had been subject to phenotypical transformation through intratesticular injection of liposome-exogenous DNA complex, further tests were conducted to determine whether said exogenous DNA would be transmitted to succeeding generations or not.

First, liposome-exogenous DNA complex or control solution was injected three times into ICR male mice, who were then mated with estrus ICR females (8-10 weeks old, estrus was induced by gonadotropins) two days after the final injection. Samples were taken from the tails of offspring of this mating (F0) on the fourth week after birth, and subjected to DNA analysis by PCR method and Southern blotting. The method used to isolate the genomic DNA from the tail and the method of PCR analysis were identical to the same methods described in Example 2. The Southern blotting basically followed the method of Sato *et al.* (*Mol. Reprod. Develop.* 34:349-356, 1993). Specifically, 10 µg of genomic DNA was digested by *EcoRI* and *BamHI* restriction endonucleases, and then placed on a 0.8% agarose gel. The DNA on the gel was transferred to a nylon membrane filter (GeneScreenPlus™; NEN Company, USA) under alkaline conditions. The nylon membrane filter was then subjected to Southern hybridization using a <sup>32</sup>P-labeled probe (DNA fragment from part of the neo gene or beta-gal gene). After Southern hybridization the filter was washed once in 0.1 x SSC/0.01% SDS for 30 minutes at 56°C and exposed to Kodak XAR-5 film.

The results are shown in Table 2. In the experimental group, the presence of the exogenous DNA was determined in 25 out of 47 F0 individuals (53.2%). This indicates that the exogenous DNA that had been injected into the testis was transmitted via the sperms to the offspring.

The second generation of offspring (F1) produced by the F0 transgenic animals was also examined for the presence of the exogenous DNA. Genomic DNA was extracted from the tails of F1 mice according to the procedure described in Example 2. The genomic DNA was subjected to PCR analysis and Southern blotting according to the methods described in Example 2 and Example 4. The partial results are shown in Fig. 7. In Fig. 7, the individuals having the exogenous DNA have been traced using PCR method on genomic DNA extracted from the tail on four-week-old individuals in F0 and F1 generations. Analysis of DNA in F0 descendants demonstrated that approximately 40% of F0 descendants were transgenic. Analysis of DNA from F1 descendants demonstrated that approximately 38% of F1 descendants were transgenic. This proportion indicates that the genomic DNA was probably transmitted to descendants in Mendelian fashion, which is exactly identical to the inheritance of the exogenous gene in the transgenic individuals obtained by the prior art method (microinjection).

Table 1

Gene expression of exogenous DNA in blastocysts sired by males subjected to intratesticular injection of exogenous DNA				
Number of injections of exogenous DNA	(x1)	(x2)	(x3)	Control (x3)
Number of 1-cell embryos recovered after mating, following intratesticular injection of exogenous DNA	82	81	21	40
Number of embryos developed to the two-cell stage (%)	82 (100)	81 (100)	20 (95.2)	40 (100)



Table 1 (continued)

Gene expression of exogenous DNA in blastocysts sired by males subjected to intratesticular injection of exogenous DNA				
Development to blastocyst (%)	53 (64.6)	61 (75.3)	20 (95.2)	38 (95.0)
Number of blastocysts exhibiting beta-gal activity / Number of all blastocysts tested	1/53	25/61	16/20	0/38
Ratio (%) of blastocysts exhibiting beta-gal activity	1.9	41.0	80.0	0.0

Table 2

Detection of exogenous DNA and its expression in embryos and newborns obtained from matings with females by males subjected to intratesticular injection of exogenous DNA		
Number of injections of exogenous DNA	(x3)	Control (x3)
Number of 13-day-old embryos showing beta-gal activity / Number of all 13-day-old embryos obtained in the experiment	18/53	0/21
Ratio (%) of embryos showing beta-gal activity	34.0	0
Number of 13-day-old embryos with exogenous DNA / Number of all 13-day-old embryos obtained in the experiment	4/14	0/10
Ratio (%) of embryos with exogenous DNA	28.6	0
Number of newborns having exogenous DNA / Number of all newborns obtained in the experiment	25/47	0/15
Ratio (%) of newborns having exogenous DNA	53.2	0

EXAMPLE 5 Transmission of the exogenous DNA to the successor generation (F3) from the transgenic individual (F0)

Whether a liposome-exogenous DNA complex can be detected in the successor generations, F1, F2 and F3, or not was investigated by increasing the number of animals according to the same procedure as Example 4. The result is shown in Table 3 and Fig. 7.

Table 3

Number of injections of exogenous DNA	F0	F1	F2	F3
Number of newborns having exogenous DNA/ Number of all newborns obtained in the experiment	39/107	28/74	14/45	14/52
Ratio (%) of newborns having exogenous DNA	36.4	37.8	31.1	26.9

Judging from the results, the invented method permits the preparation of a transgenic animal more conveniently and efficiently as shown in the similar result of Example 4.

#### Industrially Applicable

The present invention relates to a method for preparing a non-human vertebrate transgenic animal, by injecting an exogenous DNA which is complexed with liposome, for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells, into a testis of a mature non-human vertebrate male. The number of injection is carried out preferably three times or more. Then a transgenic animal can be prepared by mating said male with a female of which egg has not been fertilized yet by artificial insemination or *in-vitro* fertilization using a sperm produced by the testis of said male.

The method of preparing a transgenic animal is extremely important as a technology for preparing a domestic animal with effective gene and a human disease model animal for medical development. The established method for pre-



paring such animals is a microinjection method by using a micromanipulator to inject an exogenous DNA into a pronucleus of a fertilized egg. However, a certain problems are encountered; this method is time-consuming, the number of treatment at once is limited, the operation requires specialized skills and it requires the use of an expensive micromanipulator.

5 By using the present method, an exogenous DNA can be injected into 100,000 or more sperm cells at once, which is extremely effective for a domestic animal of which egg is hard to handle by microinjection. Moreover, the present invention is industrially applicable to prepare a transgenic animal simply because a lot of sperm cells containing an exogenous DNA are subject to freeze and thaw for use at a more convenient time, and lend themselves to the use of artificial insemination or *in vitro* fertilization.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

## SEQUENCE LISTING

5           SEQ ID NO: 1:  
            SEQUENCE LENGTH: 21  
            SEQUENCE TYPE: nucleic acid  
10           STRANDEDNESS: single  
            TOPOLOGY: linear  
            MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
15           ORIGINAL SOURCE: none  
            ORGANISM: none  
20           STRAIN: none  
            FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
                    4035 to 4055 on the beta-gal gene; called "MI499 beta-gal"  
25           SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:  
            GACCGCTGGG ATCTGCCATT G  
30  
            SEQ ID NO: 2:  
            SEQUENCE LENGTH: 21  
35           SEQUENCE TYPE: nucleic acid  
            STRANDEDNESS: single  
            TOPOLOGY: linear  
40           MOLECULE TYPE: other nucleic acid  
            ORIGINAL SOURCE: none  
            ORGANISM: none  
45           STRAIN: none  
            FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
                    4278 to 4298 on the beta-gal gene; called "MI500 beta-gal"  
50           SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:  
            TACTGACGGG CTCCAGGAST C  
55

SEQ ID NO: 3:

SEQUENCE LENGTH: 26

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid

ORIGINAL SOURCE: none

ORGANISM: none

STRAIN: none

FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
1752 to 1767 on the neo gene; called "MI1511 neo"

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

TCGTGGCTGG CCACGACGGG CGTTCC

SEQ ID NO: 4:

SEQUENCE LENGTH: 16

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid

ORIGINAL SOURCE: none

ORGANISM: none

STRAIN: none

FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
1846 to 1861 on the neo gene; called "MI1512 neo"

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GACAGGAGAT CCTGCC

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

## (i) APPLICANT:

(A) NAME: Hoechst Marion Roussel Ltd.  
 (B) STREET: 17-51 Akasaka 2-Chome  
 (C) CITY: Minato-ky, Tokyo  
 (E) COUNTRY: Japan  
 (F) POSTAL CODE (ZIP): 107  
 (G) TELEPHONE: 0081 3 55716402  
 (H) TELEFAX: 0081 3 55716213

(A) NAME: OGAWA Shyoso  
 (B) STREET: 16-12 Akazutsumi 4-Chome  
 (C) CITY: Setagaya-ku, Tokyo  
 (E) COUNTRY: Japan  
 (F) POSTAL CODE (ZIP): 156

(A) NAME: IWAYA Makto  
 (B) STREET: 8-10 Mishuku 1-Chome  
 (C) CITY: Setagaya-ku, Tokyo  
 (E) COUNTRY: Japan  
 (F) POSTAL CODE (ZIP): 154

(ii) TITLE OF INVENTION: Method for preparing transgenic animal

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

## (iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible  
 (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

## (v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER: EP 96932037.3

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

## (ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: /note= "primer for recognizing the  
 nucleotides from numbers 4035 to 4055 on the beta-gal gene;  
 called "M1499 beta-gal" "

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

GACCGCTGGG ATCTGCCATT G

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

5 (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
 (A) ORGANISM: none  
 (B) STRAIN: none

10 (ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION:/note= "primer for recognizing the  
 nucleotides from numbers 4278 to 4298 on the beta-gal gene;  
 called "M1500 beta-gal""

15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

TACTGACGGG CTCCAGGAGT C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

20 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 26 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

25 (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(vi) ORIGINAL SOURCE:  
 (A) ORGANISM: none  
 (B) STRAIN: none

30 (ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION:/note= "primer for recognizing the  
 nucleotides from numbers 1752 to 1767 on the neo gene; called  
 "M1511 neo""

35 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

TGGTGGCTGG CCACGACGGG CGTTCC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

40 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 16 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

45

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION:/note= "primer for recognizing the  
 nucleotides from numbers 1846 to 1861 on the neo gene; called  
 "M1512 neo""

50

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GACAGGAGAT CCTGCC

16

55

## SEQUENCE LISTING

5 SEQ ID NO: 1:

SEQUENCE LENGTH: 21

10 SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

15 MOLECULE TYPE: other nucleic acid

ORIGINAL SOURCE: none

ORGANISM: none

20 STRAIN: none

FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
4035 to 4055 on the beta-gal gene; called "MI499 beta-gal"

25 SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1;

GACCGCTGGG ATCTGCCATT G

30 SEQ ID NO: 2:

SEQUENCE LENGTH: 21

35 SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

40 MOLECULE TYPE: other nucleic acid

ORIGINAL SOURCE: none

ORGANISM: none

45 STRAIN: none

FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
4278 to 4298 on the beta-gal gene; called "MI500 beta-gal"

50 SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2;

TACTGACGGG CTCAGGAGT C

SEQ ID NO: 3:

SEQUENCE LENGTH: 26

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid

ORIGINAL SOURCE: none

ORGANISM: none

STRAIN: none

FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
1752 to 1767 on the neo gene; called "MI1511 neo"

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

TCGTGGCTGG CCACGACGGG CGTTCC

SEQ ID NO: 4:

SEQUENCE LENGTH: 16

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid

ORIGINAL SOURCE: none

ORGANISM: none

STRAIN: none

FEATURE: primer for recognizing the nucleotides from numbers  
1846 to 1861 on the neo gene; called "MI1512 neo"

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

TACAGGAGAT CCTGTC



## Claims

1. A method for preparing a sperm containing an exogenous DNA, wherein the exogenous DNA together with liposome for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells is injected into a testis of a mature non-human vertebrate male and the sperm containing the exogenous DNA is produced in the testis of said male.
2. The method for preparing a sperm containing an exogenous DNA as claimed in claim 1, wherein the injection into a testis is repeated three times or more.
3. The method for preparing a sperm containing an exogenous DNA as claimed in claim 1 or 2, wherein said mature non-human vertebrate animal is a mouse.
4. A method for preparing a transgenic non-human vertebrate animal, wherein an exogenous DNA together with liposome for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells is injected into a testis of a mature non-human vertebrate male and a sperm containing an exogenous DNA produced in the testis of said male is mated with an egg which has not been fertilized yet.
5. A method for preparing a transgenic non-human vertebrate animal, wherein an exogenous DNA together with liposome for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells is injected into a testis of a mature non-human vertebrate and a sperm containing an exogenous DNA produced in the testis of said male is mated with an estrus female, making the female pregnant and delivered.
6. A method for preparing a transgenic non-human vertebrate animal, wherein an exogenous DNA together with liposome for the purpose of transduction of DNA into mammalian cells is injected into a testis of a mature non-human vertebrate and a sperm containing an exogenous DNA produced in the testis of said male is mated with a female, by artificial insemination or *in vitro* fertilization, making the female pregnant and delivered.
7. The method for preparing a transgenic non-human vertebrate animal as claimed in either one of the claims 4 to 6, wherein the injection into a testis is repeated three times or more.
8. The method for preparing a transgenic non-human vertebrate animal as claimed in either one of the claims 4 to 7, wherein said mature non-human vertebrate animal is a mouse.

Fig. 1

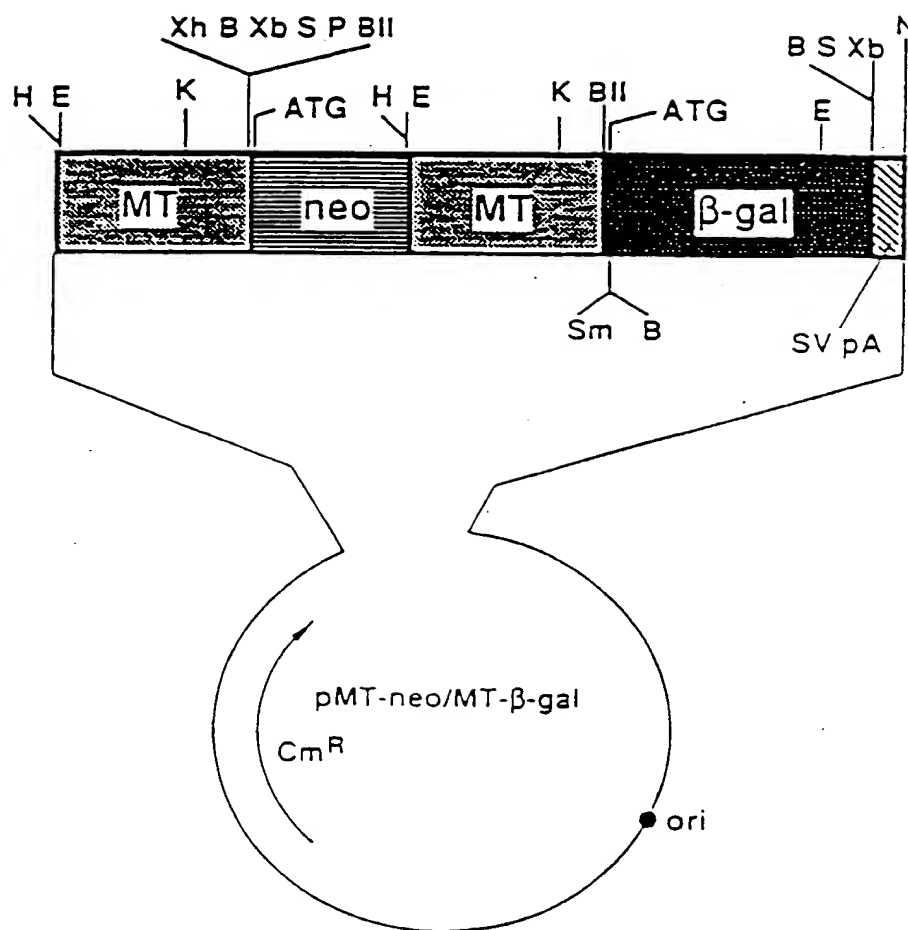


Fig. 2

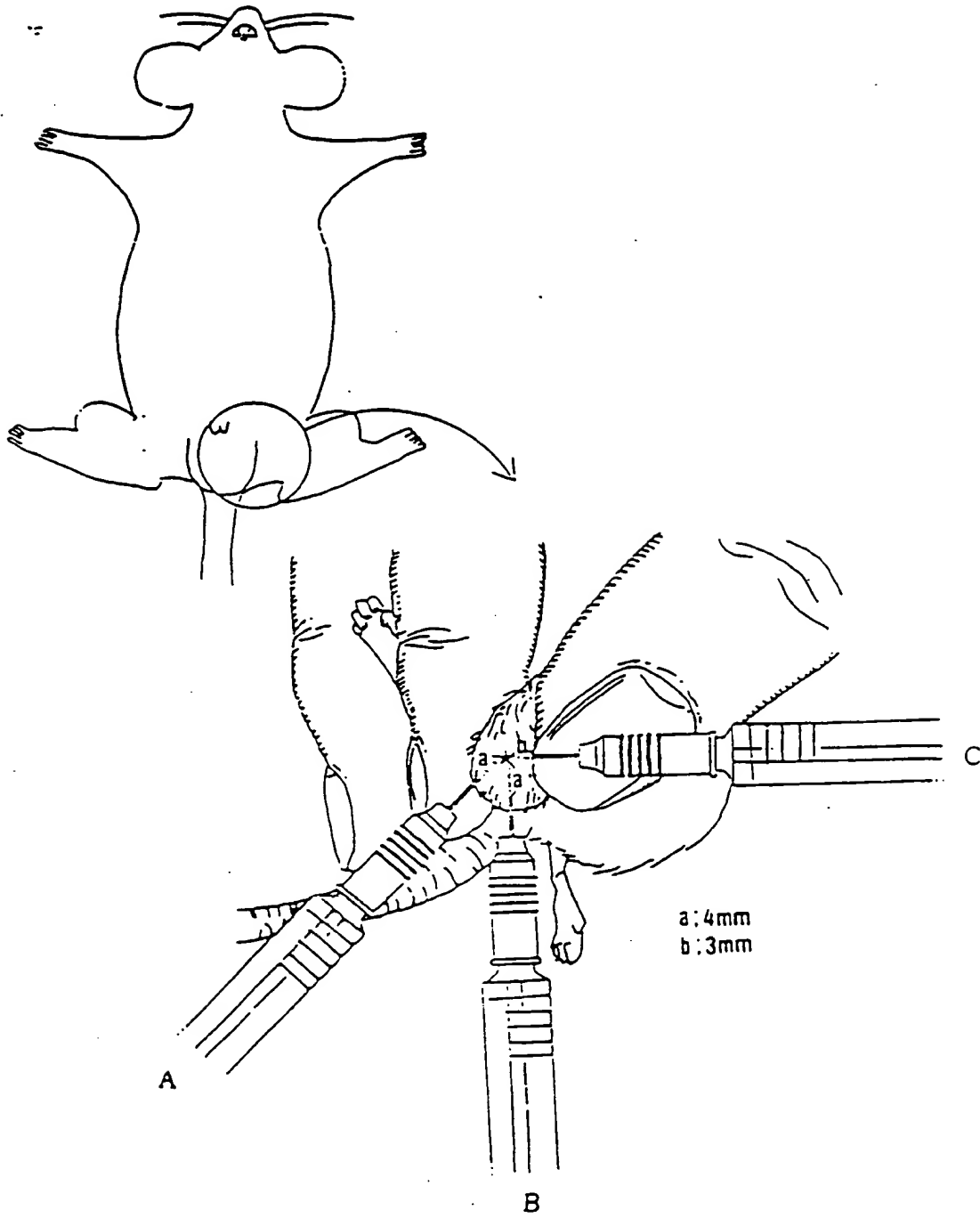


Fig. 3

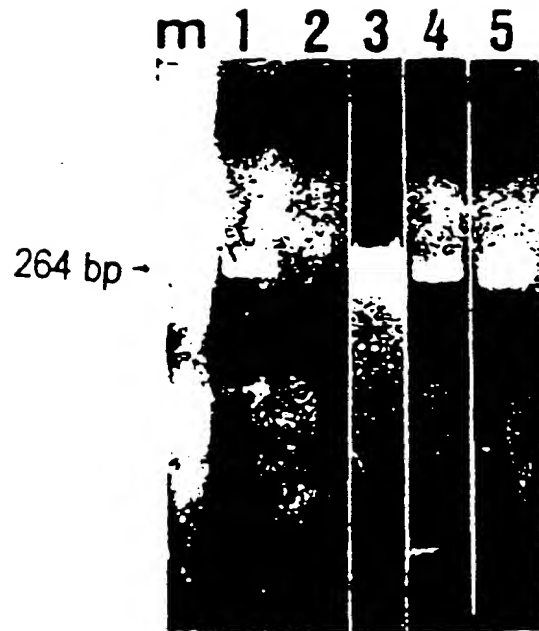


Fig. 4

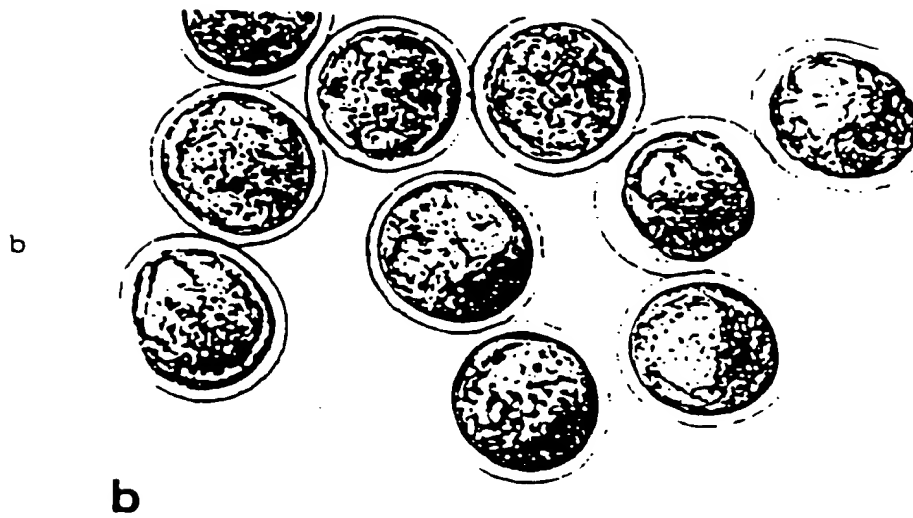


Fig. 5

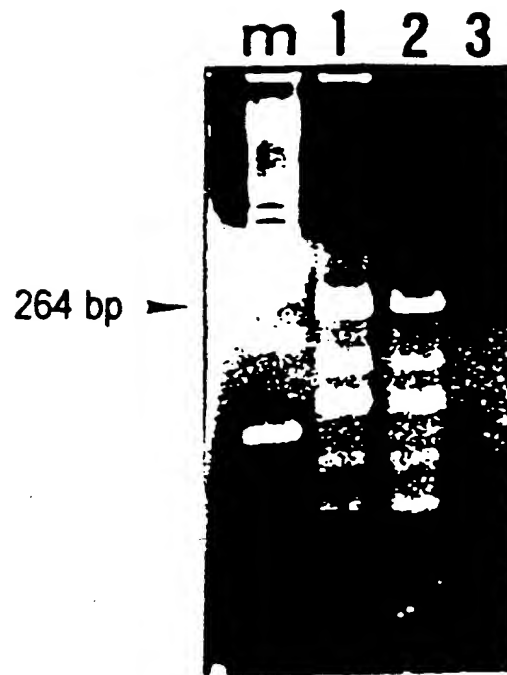


Fig. 6

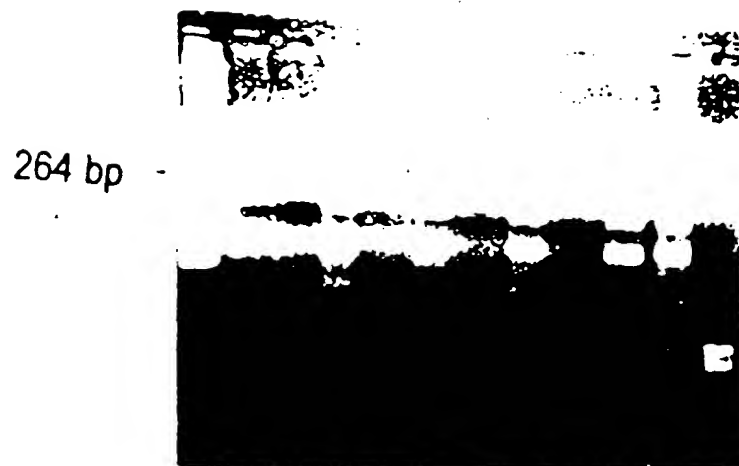
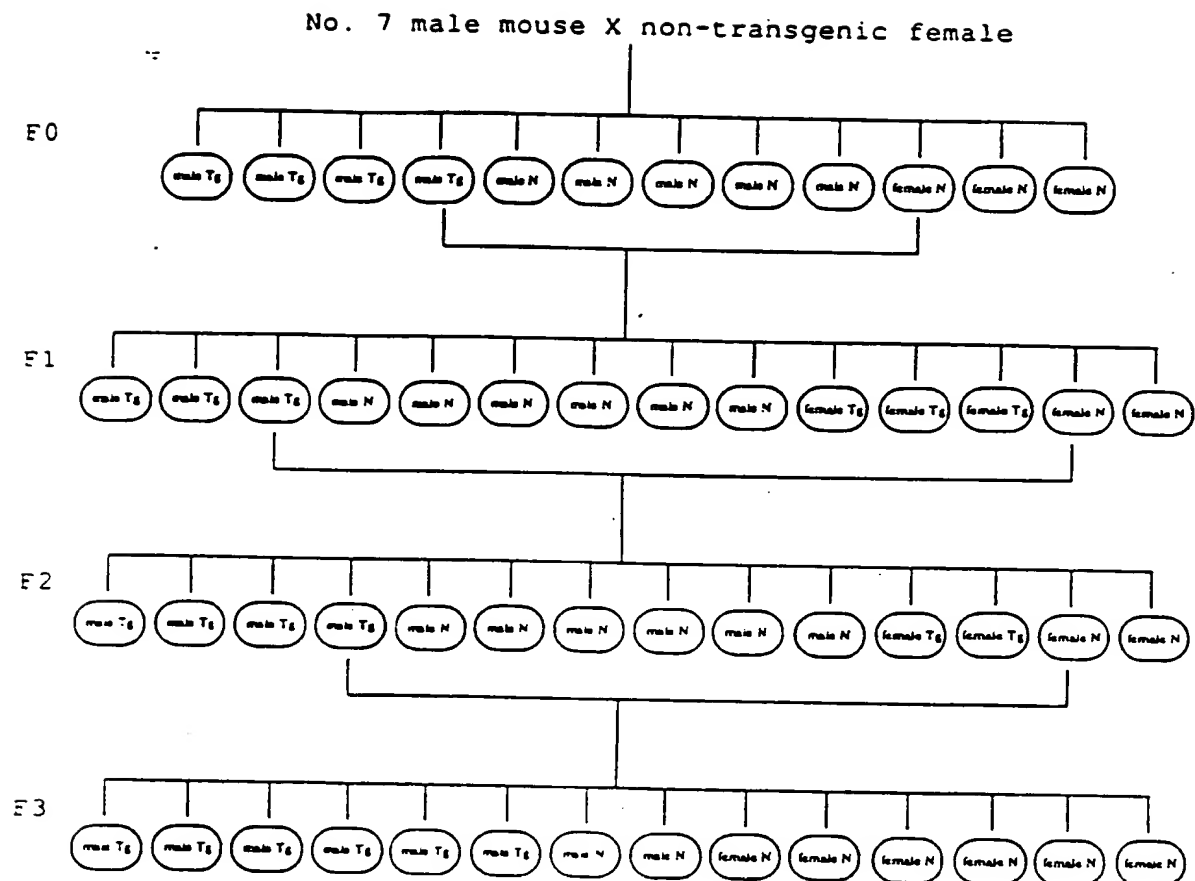


Fig. 7



Tg : a transgenic mouse  
 N: a non-transgenic mouse



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02828

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl <sup>6</sup> A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl <sup>6</sup> A01K67/027		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Animal Biotech. Vol. 5, No. 1 (1994), p. 19-31 especially p. 27, M. Sato et al. "Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer"	1 - 8
A	Science Vol. 261 (1993), p. 209-211, Zhu N. et al. "Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice"	1 - 8
A	Mol. Reprod. Dev. Vol. 30 (1993), p. 194-200, Bachiller D. et al. "Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells"	1 - 8
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86 (1989), p. 6982-6986, Behr J.P. et al. "Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA"	1 - 8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search October 9, 1996 (09. 10. 96)		Date of mailing of the international search report October 22, 1996 (22. 10. 96)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)



(51) 国際特許分類6  
A01K 67/027

A1

(11) 国際公開番号

WO97/11597

(43) 国際公開日

1997年4月3日(03.04.97)

(21) 国際出願番号

PCT/JP96/02828

(22) 国際出願日

1996年9月27日(27.09.96)

(30) 優先権データ

特願平7/275110

1995年9月29日(29.09.95)

JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

ヘキスト薬品工業株式会社(HOECHST PHARMACEUTICALS  
& CHEMICALS K.K.)(JP/JP)

〒107 東京都港区赤坂2丁目17番51号 Tokyo, (JP)

(71) 出願人: および

(72) 発明者

尾川昭三(OGAWA, Shyoso)(JP/JP)

〒156 東京都世田谷区赤堤4丁目16番12号 Tokyo, (JP)

岩谷 誠(IWAYA, Makoto)(JP/JP)

〒154 東京都世田谷区三宿1丁目8番10号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)

佐藤正宏(SATO, Masahiro)(JP/JP)

〒259-11 神奈川県伊勢原市上粕屋246番地107号  
Kanagawa, (JP)

多田昇弘(TADA, Norihiro)(JP/JP)

〒336 埼玉県浦和市大間木2394番地2 Saitama, (JP)

(74) 代理人

弁理士 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.)

〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地

麹町広洋ビル Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類

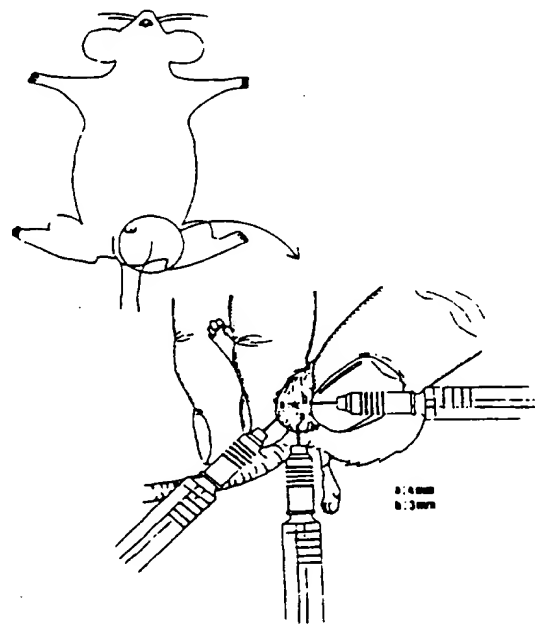
国際調査報告書

(54) Title: METHOD FOR PREPARING TRANSGENIC ANIMAL

(54) 発明の名称 トランスジェニック動物の作成方法

(57) Abstract

A method for preparing spermatozoa having an alien DNA of a mature male nonhuman vertebrate transduced thereinto which comprises injecting the alien DNA carried by a liposome for transduction into the testes of the animal thrice or more repeatedly and thus producing spermatozoa having the alien DNA transduced thereinto in the testes of the animal. A transgenic nonhuman vertebrate can be conveniently and efficiently produced by fertilizing an unfertilized egg with such a spermatozoon by natural crossing, artificial fertilization or external fertilization.



(57) 要約

非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リボソームに保持させた外来性DNAを3回以上反復して注入し、該雄の精巣で外来性DNA導入精子を産生させることからなる、前記動物の外来性DNA導入精子の作成方法。かくして作成された外来性DNA導入精子を自然交配、人工受精または体外受精により該脊椎動物の未受精卵と受精させることにより、簡便に効率よく、トランスジェニック非ヒト脊椎動物を作成することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	EG	エジプト	LS	レソト	RD	ロンド
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バハマ	GB	グレートブリテン及び北アイルランド連合王国	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GE	ジョージア	MC	モナコ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SS	ス威士ランド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	ST	セント・ヘレナ、アセンション及びトリスタン・ダ・コング
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	WL	ウィル	TM	トルクメニスタン
CC	ココス（キリング）諸島	IE	アイルランド	MR	モロッコ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	モザンビーク	UA	ウクライナ
CG	コンゴ（ブラザビル）	JP	日本	MX	メキシコ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	NL	オランダ	US	米国
CI	コートジボワール	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CN	中国	KG	キルギス	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>6</sup> A01K 67/027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>6</sup> A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Animal Biotech. Vol.5 No.1 (1994) p.19-31 especially p.27. M.Sato et al "Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer"	1-8
A	Science Vol.261 (1993) p.209-211, Zhu N. et al, "Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice"	1-8
A	Mol.Reprod.Dev. Vol.30 (1993) p.194-200, Bachiller D. et al "Liposome- mediated DNA uptake by sperm cells"	1-8
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.86 (1989) p.6982-6986, Behr J.P. et al "Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine- coated DNA"	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
09.10.96

国際調査報告の発送日

22.10.96

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
 長井 啓子

2 B 9 1 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)



## 明 細 書

## トランスジェニック動物の作成方法

## 技術分野

本発明は、トランスジェニック動物を簡便に且つ効率的に作成する方法に関する。詳しくは、本発明は、非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に外来性DNAを注入し、該雄の精巣で外来性DNA導入精子を作成することからなる前記動物の外来性DNA導入精子の作成方法に関する。さらに本発明は、上記の方法により得られた外来性DNA導入精子を前記非ヒト脊椎動物の未受精卵と受精させることからなるトランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法に関する。

今日、トランスジェニック動物は、様々な分野で応用されている。例えば、遺伝子発現の組織特異性および時期特異性の解析、遺伝子の生理機能の解析のため、病態解析および医薬品の有効性試験のヒト疾患モデル動物として頗る重要となっている。その作成のための確立された方法としては、受精卵前核への外来性DNAのマイクロマニピュレーター(micromanipulator)を用いた顕微注入法がある(Palmiter and Brinster, Annu Rev Genet 20: 465-499, 1986)。いくつかの研究室では、この方法がルーチンに使われているが、一般的に、顕微注入法によるトランスジェニック動物の作成は、様々な問題を伴っている。例えば、外来性DNAの顕微注入には、時間がかかり、その操作も特殊な技量を要求される。また、顕微注入のための高価なマイクロマニピュレーターを用意する必要もある。更に、ある種の動物卵では、注入すべき核が、顕微鏡下では見えないので、注入する前に、予め卵に遠心処置を施す必要がある等、極めて煩雑な方法である。さらに目的とするトランスジェニック動物の生産の成否についてもバラツキが大きい。

一方、上記顕微注入法によらないトランスジェニック動物の作成方法も試みられている。例えば、マウス精子と外来性DNAとを試験管の中



で混合させた後、この精子を未受精卵と受精させることにより、トランスジェニック動物を得る方法がある。ラビトラノら (Lavitrano et al., Cell 57: 717-723, 1989) は、この方法による成功を報じたが、その結果には、今のところ再現性が確認されていない (Brinster et al., Cell 59: 239-241, 1989)。

一方、バチラー (Bachiller) らは、上述のラビトラノ (Lavitrano) らの手法を更に進めて、単離された精子内に外来性 DNA を効率的に取り込ませるため、外来性 DNA を保持させたリポソーム (liposome) をマウス精子と共に培養した後、マウス未受精卵と受精させたが、受精卵には外来性 DNA を検出できなかった (Mol Reprod Develop 30, 194-200, 1991)。即ち、トランスジェニック動物作成には、失敗した。従って、この手法は、未だ実用性の域に達していないが、顕微注入という特殊な操作を必要としないこと、高価なマイクロマニピュレーターを用意する必要もないこと等、上述の顕微注入法にはない利点がある。

我々も従来より、別の視点から、精子を通じて外来性 DNA を卵側へ伝達するという、いわゆる精子を介した遺伝子導入法 (sperm-mediated gene transfer) の開発を試みて来た。例えば、カルシウムリン酸 (Calcium phosphate) で沈殿させた外来性 DNA を注射針で直接雄動物の精巣へ注入するという方法である (Sato et al., Animal Biotech 5, 19-31, 1994)。精巣には、精子のもととなる未分化な精祖細胞 (spermatogonia) と呼ばれる細胞から、分化の進んだ精原細胞 (spermatocyte)、更に分化した精巣内精子 (testicular spermatozoa) 等の様々なタイプの精子細胞が存在する。精巣内精子は、精子特有の活発な動きはないが、精巣から精巣上体へ輸送されるに伴い活発な動きを示すようになる。一般的に、カルシウムリン酸で沈殿させた外来性 DNA は、哺乳動物由来の培養細胞等と共存させるとその細胞へ容易に入り込む性質がある。その結果として、その細胞は外来性 DNA により形質転換されることが知られ

ている (Wigler et al., Cell 11, 223-232, 1977)。従って、このカルシウムリン酸で沈殿させた外来性DNAを精巣へ注入すれば、精巣内精子細胞は、その外来性DNA導入によって、形質転換されると考えられる。もし、このような形質転換された精子（外来性DNAを有する）が放出され、雌動物卵管内で卵と受精すれば、精子内に存在する外来性DNAは、受精卵の染色体へ伝達されるものと想像される。即ち、トランスジェニック受精卵の誕生である。もし、この方法によりトランスジェニック動物が作成出来れば、10万匹以上の精子へ一度に外来性DNAを導入出来ると共に、家畜の場合のように、受精卵への外来性DNAの顕微注入が難しい場合には、極めて有用な手段となり得る。また、外来性DNAを導入した多数の精子を凍結保存しておき、適時融解して、人工受精あるいは体外受精を施すことにより、トランスジェニック動物を容易に得ることも可能である。

我々は、この仮説に基づき、上述のように、カルシウムリン酸で沈殿させた外来性DNAを注射針で直接雄マウスの精巣へ注入する実験を行った。その結果、外来性DNAは、射精された精子内に存在することが確認出来たが、受精後の卵には、外来性DNAを検出することは出来なかった (Sato et al., Animal Biotech 5, 19-31, 1994)。

#### 発明の開示

本発明の目的は、従来の顕微注入法によらないトランスジェニック動物の簡便且つ効率的作成法を提供し、これにより、短期間に大量のトランスジェニック動物を得ることである。このことにより、従来、牛等の大型家畜のトランスジェニック化が難しいとされてきた問題も解消出来るものと期待される。

本発明は、非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リボソームに保持させた外来性DNAを注入し、該雄の精巣で外来性DNA導入精子を産生させることからなる、前記動物の外来性DNA導入精子の作

成方法に関する。

さらに本発明は、非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リポソームに保持させた外来性DNAを注入し、該雄の精巣で産生された精子を前記脊椎動物の未受精卵と受精させることからなる、トランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法に関する。

本発明の方法は、外来性DNAを遺伝子導入用リポソームに保持させ、これを脊椎動物の成熟雄の精巣に直接注入することに特徴を有する。

本発明において、外来性DNAとはプラスミドDNAを意味する。外来性DNAには特に限定はなく、目的とする形質を発現させるための種々のDNAが特に制限なく使用されうる。外来性DNAを保持させるリポソームとしては、哺乳動物細胞への遺伝子導入のために従来使用されている遺伝子導入用リポソーム（カチオン性リポソーム）を使用する。このようなリポソームとしては、リポフェクチン（LIPOFECTIN™：N-[1-(2,3-dioleyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) と dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) とを1:1 (w/w)の割合で含むリポソーム、GIBCO-BRL社製）が好適に使用されるが、その他TransIT™-LT1 MIR2310, TransIT™-LT2 MIR2320, TransIT™-LT100 MIR2100（宝酒造株式会社製）、Genetransfer 074-03621, TRANSFECTAM 561-36591（和光純薬株式会社製）およびDOSPER（ベーリンガー・マンハイム株式会社製）なども使用されうる。リポソームへの外来性DNAの保持は、それ自体公知の方法により、例えば外来性DNAをリポソーム含有溶液に加えて混合し、インキュベーションすることにより行われる。

外来性DNAを保持したリポソームは非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣へ直接注入される。注入は3回以上反復して実施するのが望ましい。注入に際しては、上記リポソーム含有液を注射針にて麻酔処理された成熟雄動物の両方の精巣へ、精巣を包む陰嚢(scrotum) から直接挿入し注

入する。この注入操作を4日置きに最低3回行う。外来性DNA保持リポソームの最終注入後、2日目には該雄の精巣で外来性DNAを導入された精子が産生される。

トランスジェニック動物は、上記雄動物を性腺刺激ホルモンで誘起された発情期の雌動物と交配させ、雌動物に妊娠、分娩させることにより得られる。

トランスジェニック動物は、上記雄動物の精巣で産生された外来性DNA導入精子を用いて人工受精または体外受精により雌動物に妊娠させ、分娩させることによって得ることもできる。

本発明の方法が適用される非ヒト脊椎動物の例としては、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコなどの実験用動物、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジなどの家畜があげられる。

本発明の方法で得られたトランスジェニック動物は通常の条件で飼育し、繁殖させることができる。

受精卵あるいは生まれた動物が外来性DNAを有するか否かは次のごとくして確認される。

交配に付された一部の雌を交配が確認された日（妊娠1日目とする）に屠殺し、子宮内精子および卵管内の存在する受精卵（1細胞期胚）を採取する。これらサンプルは、外来性DNAの存在の解析に付される。その他の雌は、妊娠中期、または、出産まで生存させる。妊娠中期では、胎児を摘出した後、そのDNAを抽出し、サザンブロッティング（Southern blotting）（Southern, J Mol Biol 98, 503-517, 1975）またはPCR法（Saiki et al., Science 239, 487-491, 1988）により、外来性DNAの胎児染色体への組み込み率を確認する。同様に、生まれた個体に対しても、生後5日目に尾部DNAを抽出し、外来性DNAの存在を調べる。

生み出されたトランスジェニック個体（これを初代トランスジェニッ

ク動物 (founder) あるいはF 0 と呼ぶ) は、正常動物と交配させ、その子孫を得る。F 0 の次の世代であるF 1 個体、さらにF 2 個体及びF 3 個体についてサザンブロッティングまたはPCR法によるDNA解析を行い、F 0 からF 3 へ外来性DNAが伝達されているかどうかを検討する。

#### 図面の簡単な説明

図1は導入DNA用プラスミドpMT-neo/MT- $\beta$ -galのプラスミドマップを表した図である。

マウスメタロチオネイン-Iプロモーター (MT) のDNA配列、ネオマイシン耐性遺伝子 (neo) をコードするDNA配列および繰り返されたマウスメタロチオネイン-IプロモーターのDNA配列の下流に $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 ( $\beta$ -gal) をコードするDNA配列を有する。

図中の記号の説明：H, Hind III制限酵素部位；E, Eco R I制限酵素部位；K, Kpn I制限酵素部位；Xh, Xho I制限酵素部位；B, Bam H I制限酵素部位；Xb, Xba I制限酵素部位；S, Sal I制限酵素部位；P, Pst I制限酵素部位；B II, Bgl II制限酵素部位；Sm, Sma I制限酵素部位；ATG, 蛋白翻訳開始部位；SV pA, SV40ポリ付加シグナル部位；N, Not I制限酵素部位；Cm<sup>R</sup>, クロラムフェニコール耐性遺伝子；ori, 複製開始点を示す。

図2は外来性DNA保持リボソームを成熟ICR雄マウスの両方の精巣へ向けて直接注入する操作の模式図である。

図3は3回目の外来性DNA保持リボソームを注入後、得られた子宮内射精精子由来ゲノムDNAのPCR解析の写真（プライマーは、MI499 $\beta$ -gal、MI500 $\beta$ -galを使用）である。mは、分子量マーカを示す。

図4(a)および図4(b)は3回目の外来性DNA保持リボソームを注入後、得られた胚盤胞の顕微鏡写真であり、図4(c)は妊娠13日目胚の写真である。図4(a)における矢印は $\beta$ -gal酵素活性を示さない胚盤胞、

図4(c)におけるTgは外来性DNAを有し、 $\beta$ -gal酵素活性を示す胚、そしてNon-Tgは $\beta$ -gal酵素活性を示さない非トランスジェニック胚である。

図5は3回目の外来性DNA保持リボソームを注入後、得られた胚盤胞由来ゲノムDNAのPCR解析の写真(プライマーは、MI499  $\beta$ -gal、MI500  $\beta$ -galを使用)である。mは、分子量マーカを示す。

図6は3回目の外来性DNA保持リボソームを注入後、得られた妊娠13日目の胎児の尾由来ゲノムDNAのPCR解析の写真(プライマーは、MI499  $\beta$ -gal、MI500  $\beta$ -galを使用)である。Mは、分子量マーカを示す。

図7は精巣へ外来性DNAの注入を受けた雄No. 7由来の子孫の系図である。

#### 実施例

次に、実施例を示して本発明の方法をさらに具体的に説明する。尚、本発明は実施例に限定されるものではない。

##### 実施例 1

##### 導入DNA用プラスミドpMT-neo/MT- $\beta$ -galの構築

マウスメタロチオネイン-Iプロモーター {metallothionein-I promoter(MT)}断片(約1.9kb)をpMGH (Palmiter et al., Nature 300, 611-615, 1982)からEcoRI/BglII消化により切断して単離し、これをpHSG396プラスミド(約2.3kb; Takeshita et al., Gene 71, 9-18, 1988)のEcoRI/BglII制限酵素部位へ導入した。これをpMT/Iと称する。次いで、ネオマイシン(neomycin)耐性遺伝子(約1.5kb; neo)をpHSG294プラスミド(Brady et al., Gene 27, 223-232, 1984)よりBglII/HindIII制限酵素消化により単離し、pMT/IのBglII/HindIII制限酵素部位へ挿入し、pMT/neo-1を構築した。これにより、neoをMTの制御下で発現させることにより、neo発現ユニット(MT-neo)を含むベクタ

一が構築された。発現ユニットとは遺伝子を発現するための構築体、通常、プロモーター+遺伝子 (cDNAやゲノムDNA) から成る。

一方、MTと大腸菌由来の $\beta$ -gal遺伝子 (約3 kb、SV40ポリA付加部位をその3'末端側に含む) とを融合させた約5 kbの $\beta$ -gal発現ユニット (MT- $\beta$ -gal) をpMT/ $\beta$ -gal-1 (Sato et al., Mol Reprod Develop. 34, 349-356, 1993) から単離し、これをpMT/neo-1のHindIII制限酵素部位 (MT-neoの下流側) へ挿入した。この際、MT- $\beta$ -galの3'末端側には、Not I リンカー (ベーリンガーマンハイム社) を設置してある。この操作によって得られた構築体は、pMT-neo/MT- $\beta$ -gal (約10 kb; 図1参照) と称される。このプラスミドの中には、MT-neoとMT- $\beta$ -galが直列に連結された形のneo発現ユニットおよび $\beta$ -gal発現ユニットが含まれる。なお、導入DNA用プラスミドとしては、今回、pMT-neo/MT- $\beta$ -galを用いているが、MT-neoやMT- $\beta$ -galの代わりに別の興味ある遺伝子の発現ユニットを用いることもできる。

## 実施例 2

成熟雄マウス精巣への外来性DNA (pMT-neo/MT- $\beta$ -gal) 保持リボソームの注入及び注入後の精巣から交配によって得られた子宮内精子 (in-trauterine spermatozoa) 並びに胚盤胞における外来性DNAの検出

精巣への外来性DNA保持リボソームの注入によって、精巣内精子が形質転換を受け、これら精子が雌との交配によって、精巣から放出された結果、雌子宮内に存在する精子に外来性DNAが存在するかどうか、また、これら精子と受精した受精卵にも外来性DNAが存在するかどうかの検討を試みた。

先ず、プラスミドpMT-neo/MT- $\beta$ -gal DNAを制限酵素Not Iで切断し、直鎖状とする。この直鎖状DNA約5  $\mu$ gとリボソーム (LIPOFECTIN™ (GIBCO-BRL社; リン酸緩衝液PBS, pH7.2に溶解)) とを



室温下にて、1 : 1 の割合で混合し15分間静置した。この方法は、製造元の指針に基づいた。この過程で、外来性DNA (pMT-neo/MT- $\beta$ -gal) は、リボソームの脂質層に囲まれることとなり、いわゆる、外来性DNA保持リボソームが形成される。対照としては、PBSでリボソームを1 : 1 の割合で混合したものを作成しコントロールとした。

この外来性DNA保持リボソームまたはコントロール溶液は、1/6ゲージ注射針にて吸引され、おおよそ20 $\mu$ l量を麻酔下の成熟ICR雄マウス(8~10週齢、日本クレア社)の両方の精巣へ向けて、陰囊から直接注入される。注入の過程を模式化し、図2に表した。リボソーム注入後、2日目に発情期ICR雌(8~10週齢、日本クレア社；性腺刺激ホルモンにより、発情期を誘発)と交配し、卵管内より受精卵(1細胞期胚)及び子宮内精子を回収した。回収された受精卵は、ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去した後、1 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>(MT活性を上げるのが目的)を含む100 $\mu$ lのM16培養液(Whittingham, J Reprod Fert 14 (Suppl), 7-21, 1971)(パラフィンで覆われる)にて37°C、5%CO<sub>2</sub>/95%空気の気相下、3日間培養することにより、胚盤胞まで発生させた。発生した胚盤胞は、PCR法によるDNA解析を行い、外来性DNAの有無の検索を試みた。更に、一部の胚盤胞については、導入遺伝子の発現を調べるために $\beta$ -gal活性を組織化学的に解析した。PCR法によるDNA解析は、サイキらの方法(Saiki et al., Science 239, 487-491, 1988)に準じた。この際、用いたプライマーセットは2種あり、一つは、 $\beta$ -gal遺伝子の3'側の領域を認識するプライマーMI499 $\beta$ -gal(配列表配列番号1)およびプライマーMI500 $\beta$ -gal(配列表配列番号2)(Molecular Cloning-A Laboratory Manual, CSH, NY, 1982)、もう一つは、neo遺伝子の5'側の領域を認識するプライマーMI1511 neo(配列表配列番号3)およびプライマーMI1512 neo(配列表配列番号4)(Gene 19, 327-336, 1982)を用いた。9 $\mu$ lの反応液[10mM Tris-Cl, pH8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM

KCl, 0.01% (w/v) ゼラチン, 200  $\mu$ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 50pMの各種プライマー, 0.1  $\mu$ lのTaqポリメラーゼ] に1  $\mu$ l (約1  $\mu$ gに相当) のゲノム (genomic) DNAもしくは、胚盤胞を含む溶液を加えたものを、36サイクルのPCR反応に付した。反応液を、1分間95℃にて変性 (denaturation) させた後、1分間58℃にてアニーリング (annealing) し、更に、4分間75℃にて伸長反応 (extension) に付した。次いで、反応液は4%アガロースゲルによる電気泳動に付され、ゲルは、臭化エチジウム (ethidium bromide) 染色に付された。染色後、ゲルを紫外線照射することにより増幅された外来性DNAの存在を確認する。

$\beta$ -galに対する組織化学的解析は、次のように行った。即ち、検体 (胚盤胞) をPBSに混和した1.25%グルタルアルデヒド (glutaraldehyde) にて5分間、室温にて固定後、0.05%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSAと略す) を含むPBS 50  $\mu$ lの小滴の中で三回洗浄した。その後、検体を1.2mM 5-D-galactopyranoside (X-Gal)、1mM  $MgCl_2$ 、0.1%トリトンX-100 (Triton X-100)、3mM  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  (P3289; Sigma社)、3mM  $K_3Fe(CN)_6$  (P3667; Sigma社) を含むPBS (50  $\mu$ l) 中にて、約24時間、37℃下で反応させた。この操作により、 $\beta$ -gal活性を示す検体の細胞質内は青く染色される。一方、 $\beta$ -gal活性を示さない検体の細胞質は、全く染色されない。

回収された子宮内精子は、ゲノムDNAの単離に付された。ゲノムDNAの単離は、佐藤らの方法 (Sato et al., Animal Biotech 5, 19-31, 1994) に準じて行った。即ち、軽い遠心で沈殿させた子宮内精子を700  $\mu$ lの溶解用バッファー (lysis buffer) [150  $\mu$ g/ $\mu$ l proteinase K (No. 24568: メルク社)、0.5mg/ $\mu$ lプロナーゼE (Pronase E) (化研科学社)、100mM NaCl、0.4% SDS、10mM Tris buffer、10mM EDTA、pH 8.0] の中に投じ、37℃、24~48時間融解させた。100  $\mu$ lフェノールをその融解液に加え、その上清を抽出した。次いで、この上清を80  $\mu$ g/

■ $\mu$ lのリボヌクレアーゼA (RNase A) にて37℃、30分間処理した後、混在するRNAを分解した。そして、この上清から700 $\mu$ lのイソプロパノール (isopropanol) を処理することによってDNAの沈殿物を得た。このDNA沈殿物をギルソン社のイエローチップ (Gilson Yellow tip) にて拾い上げ、70%エタノール (ethanol) にて洗浄後、70 $\mu$ lのTEバッファー (10mM Tris buffer、1mM EDTA、pH7) に融解した。この子宮内精子由来ゲノムDNAは、2種類のプライマーセットを用いたPCR解析に付され、外来性DNAの有無の検索が試みられた。

外来性DNA (pMT-neo/MT- $\beta$ -gal) 保持リボソームまたは、コントロール溶液を精巣内へ注入後、2日目に発情期雌と交配させ、受精卵を単離した。それから、 $\beta$ -galを指標とした外来性DNAの発現解析を行った(1回目の注入)。1回目のリボソームを注入後、4日目に再びリボソームまたはコントロール溶液を精巣内へ注入した。2回目のリボソーム注入を終了した雄は、注入後2日目に、発情期雌と交配させ、受精卵を単離した後、一回目の注入と同様に、DNA解析及び発現解析を行った。更に、2回目のDNAを精巣へ注入後、4日目に再びリボソームまたはコントロール溶液を注入した(3回目の注入)。通常、1回目の注入は、図2中のA方向から行い、陰囊表面から約4■の深さまで注射針を刺し、リボソームを注入する。2回目の注入は、B方向から行い、陰囊表面から約4■の深さまで注射針を刺し、リボソームを注入する。3回目の注入は、C方向から行い、陰囊表面から約3■の深さまで注射針を刺し、リボソームを注入する。3回目のリボソーム注入を終了した雄は、注入後、2日目に、発情期雌と交配させ、受精卵、子宮内精子を単離した後、PCR法による外来性DNAの検出及び $\beta$ -galを指標とした外来性DNAの発現解析を行った。以上の成績は、表1にまとめられている。また、図3には、3回目の注入後、得られた子宮内精子に外来性DNAが検出される、という結果が示されている。図3中、レーン1

は、3回目のリボソームを注入後4日目に精巣から得たゲノムDNAのPCR解析の結果を示すもので、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成が認められる。レーン2は、正常マウス尾から得たゲノムDNAのPCR解析の結果を示すもので、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成は認められない。レーン3は、精製された外来性DNA (pMT-neo/MT- $\beta$ -gal) 10pgのPCR解析の結果を示すもので、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成が認められる。レーン4、5は、3回目のリボソームを注入後2日目に雌と自然交配後、翌日得られた子宮内射精精子から得たゲノムDNAのPCR解析の結果を示すもので、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成が認められる。尚、レーン4、5のサンプルは、それぞれ異なる雄から得られたものである。図4(a, b)には、3回目の注入後、得られた胚盤胞の $\beta$ -gal活性に対する組織化学的解析の結果が示されている。図4中、aは、3回目のリボソームを注入後2日目に雌と自然交配させ、得られた胚盤胞をX-Gal存在下、反応させたもので、ほとんどの胚が染色されている。矢印で示した胚は、不染の胚である。bは、コントロール液を注入後2日目に雌と自然交配させ、得られた胚盤胞をX-Gal存在下、反応させたもので、全ての胚は不染である。図4中のcは、3回目のリボソームを注入後2日目に雌と自然交配させ、得られた妊娠13日目胚をX-Gal存在下、反応させたもので、2匹が染色されており〔これは、Tg(トランスジェニック)と見なされる〕、1匹は不染である〔これは、non-Tg(非トランスジェニック)と見なされる〕。図5には、3回目のリボソームを注入後、得られた胚盤胞由来ゲノムDNAのPCR解析図(プライマーは、MI499 $\beta$ -gal、MI500 $\beta$ -galを使用)が示されている。図5中、レーン1、2は、それぞれ、3回目のリボソームを注入後2日目に雌と自然交配させ、得られた10個及び5個の胚盤胞ゲノムDNAのPCR解析の結果を示すもので、外来

性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成が認められる。レーン3は、正常マウスから得た胚盤胞10個のゲノムDNAのPCR解析の結果を示すもので、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成は、認められない。以上の結果のまとめを以下に示す。

1) 外来性DNA保持リボソームの精巣への注入及び雌との自然交配後、採取された子宮内の射精精子には、外来性DNAの存在が認められた。

2) 外来性DNA保持リボソームの精巣への注入及び雌との自然交配後、採取された受精卵由来の胚盤胞に外来性DNAが検出された。このことから、精子を介して精巣に導入された外来性DNAが卵側に伝達されたことが考えられる。

3) 胚盤胞における外来性DNAの存在は、 $\beta$ -gal活性を指標とした組織化学的解析によっても証明された。即ち、外来性DNA保持リボソームの精巣への注入回数が増すにつれ、 $\beta$ -gal活性を示す胚盤胞の割合が高まることが判明した。

### 実施例 3

成熟雄マウス精巣への外来性DNA保持リボソームの注入及び注入後の雄動物から交配によって得られた胎児(F0)における外来性DNAの検出

精巣への外来性DNA保持リボソームの注入によって、精巣内精子が形質転換を受け、これらによって受精した受精卵由来の胎児(妊娠13日目)にも外来性DNAが存在するかどうかの試験を試みた。

まず、外来性DNA保持リボソームまたはコントロールとしての溶液を3回繰り返し注入を受けたICR雄マウスと発情期ICR雌(8~10週齢、性腺刺激ホルモンにより、発情期を誘発)とを交配させた。妊娠中期に相当する妊娠13日目に、発生した胎児を子宮から摘出し、その尾

からゲノムDNAを単離した。ゲノムDNAは、実施例2に記載される方法にてPCR解析を行った。その結果は、表2及び図6に示される。図6中、レーン1、2、4、6、8は、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成が認められず、非トランスジェニックと見なされる。レーン3、5、7、9、10は、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成が認められ、トランスジェニックと見なされる。レーンCは、正常マウス尾から得たゲノムDNAのPCR解析の結果を示すもので、外来性DNA由来の264bpのサイズの期待されるバンドの生成は、認められない。

結果をまとめると、以下ようになる。

1) ゲノムDNAのPCR解析の結果、実験群では、調べた胎児14匹中、4匹(28.6%)に外来性DNAの存在が確認された。この結果は、neo遺伝子を認識するプライマーセットを用いたPCR解析の場合でも同様であった。

2) 実験群では、調べた胎児53匹中、18匹(34.0%)に $\beta$ -gal活性を示す胎児が確認された。

3) 対照群では、調べた胎児10匹中全てにおいて、外来性DNAは存在していなかった。また、調べた胎児21匹中全てにおいて、 $\beta$ -gal活性を示す胎児は見られなかった。

以上から、本法によって外来性DNAを保有するトランスジェニック胎児が得られることが明らかとなった。

#### 実施例 4

成熟雄マウス精巣への外来性DNA保持リボソームの注入及び注入後の精巣から交配によって得られたトランスジェニック個体(F0)からの次世代(F1)への外来性DNAの伝達

精巣への外来性DNA保持リボソームの注入によって、精巣内精子が形質転換を受け、これら精子が雌との交配によって、精巣から放出さ

れた結果、これら精子と受精した受精卵由来の個体にも外来性DNAが存在し、且つ、その外来性DNAを持つ個体が、その子孫へ外来性DNAを伝達し得るかどうかの試験を行った。

先ず、外来性DNA保持リボソーム、または、コントロールとしての溶液を3回繰り返し注入を受けたICR雄マウスと発情期ICR雌マウス(8~10週齢、性腺刺激ホルモンにより、発情期を誘発)とを最終注入後2日目に交配させた。出産後、得られたマウス(F0)は生後4週目にその尾の一部を採取し、PCR法によるDNA解析、または、サザンブロッティング解析を行なった。尾からのゲノムDNAの単離及びPCRによるDNA解析等の方法は、実施例2に記載される方法に従った。サザンブロッティング解析は、基本的に佐藤らの方法(Mol Reprod Develop 34, 349-356, 1993)に準じた。即ち、10 $\mu$ gのゲノムDNAをEcoRI及びBamHI制限酵素を用い消化後これを0.8%アガロースゲルにて展開した後、ゲル内のDNAをナイロン膜フィルター(Gene Screen Plus<sup>TM</sup>; NEN社, 米国)へアルカリ条件下、転写させた。このナイロン膜フィルターは、次いで、放射性アイソトープである<sup>32</sup>Pで標識されたプローブ( $\beta$ -gal遺伝子、または、neo遺伝子の一部のDNA断片)を用いたサザンハイブリダイゼーション(Southern hybridization)に付された。サザンハイブリダイゼーション後、フィルターは、0.1 $\times$ SSC/0.01%SDSにて1回、56 $^{\circ}$ C、30分間洗浄に付された後、コダック社XAR-5フィルムに感光された。

その結果は、表2に示される。実験群では、調べた産出個体、即ち、F0個体47匹中、25匹(53.2%)に外来性DNAの存在が確認された。このことは、精巣へ注入された外来性DNAが精子を介し、産出個体にまで伝達されたことを物語る。

次に、これらF0トランスジェニック動物から得られた次世代子孫(F1)において、外来性DNAが検出されるかどうかを検討した。F1

マウスの尾の一部から実施例 2 に示される方法にてそのゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA は、実施例 2 及び実施例 4 に示される方法にて PCR 解析、または、サザンブロッティング解析に付された。その結果の一部は、図 7 に示される。図 7 中、F 0、F 1 とともに生後 4 週目の尾のゲノム DNA を PCR 法による解析を行い、外来性 DNA を持つ個体を調べた。F 0 子孫の DNA 解析の結果では、F 0 子孫の約 40% が、トランスジェニックであることが判明した。また、F 1 子孫の DNA 解析の結果では、F 1 子孫の約 38% が、トランスジェニックであることが判明した。この割合は、まさに、メンデル方式で外来性 DNA が子孫に伝達されたことを物語るもので、従来の方法（顕微注入法）で得られたトランスジェニック個体の外来性遺伝子の伝達様式と全く同じである。

表 1

外来性 DNA の精巣への注入後、雌マウスと交配して  
得られた胚盤胞における外来性 DNA の遺伝子発現

外来性 DNA 注 入 回 数	外来性 DNA の 精巣への注入、 続く雌との交配 後、回収された 1 細胞期胚数	2 細胞期 胚 の 数 (発生率%)	胚盤胞の数 (発生率%)	$\beta$ -gal 活性 を示す胚盤 胞の数／試 験に供した 胚盤胞の数	$\beta$ -gal 活性 を示す胚盤 胞の発生率 (%)
1 回	82	82 (100)	53 (64.6)	1/53	1.9
2 回	81	81 (100)	61 (75.3)	25/61	41.0
3 回	21	20 (95.2)	20 (95.2)	16/20	80.0
コントロール (3 回)	40	40 (100)	38 (95.0)	0/38	0.0



表 2

外来性DNAの精巣への注入後、雌マウスと交配して得られた胎児および出産個体における外来性DNAの検出およびその遺伝子発現

外 来 性 DNA 注入回数	$\beta$ -gal活性を示す妊娠13日目胚数／試験に供した妊娠13日目胚数	$\beta$ -gal活性を示す胚の発生率(%)	外来性DNAを持つ妊娠13日目胚数／試験に供した妊娠13日目胚数	外来性のDNAを持つ胚の発生率(%)	外来性DNAを持つ産出個体数／試験に供した産出個体数	外 来 性 DNAを持つ個体の発生率(%)
3回	18／53	34.0	4／14	28.6	25／47	53.2
コントロール(3回)	0／21	0	0／10	0	0／15	0

## 実施例 5

トランスジェニック個体(F0)から、次々々世代(F3)への外来性DNAの伝達

実施例4と同様の方法により、F0トランスジェニック動物から得られた次世代子孫(F1)、次々世代子孫(F2)、次々々世代子孫(F3)において、外来性DNAが検出されるかどうか、例数を増して検討した。その結果を表3および図7に示す。

表 3

世 代	外来性DNAを持つ産出個体数／試験に供した産出個体数	外来性DNAを持つ個体の発生率(%)
F0	39／107	36.4
F1	28／74	37.8
F2	14／45	31.1
F3	14／52	26.9

これらの結果は、実施例4の結果と同様、高い確率で外来性DNAが子孫に伝達されたことを示す。

### 産業上の利用可能性

本発明は、非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リボソームに保持させた外来性DNAを3回以上反復して注入することにより、該雄の精巣で外来性DNA導入精子を産生させ、かくして作成された外来性DNA導入精子を自然交配、人工受精または体外受精により該脊椎動物の未受精卵と受精させることからなる、トランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法である。

トランスジェニック動物を作成する方法は、医薬品開発のためのヒト疾患モデル動物や有用な遺伝子を有する家畜を作成するための技術として極めて重要である。従来、トランスジェニック動物を作成する方法として、マイクロマニピュレーターを用いて受精卵前核へ外来性DNAを注入する顕微注入法が行われているが、この方法は、注入に時間がかかる、一度に多数を処理できない、操作に特殊な技量が要求される、顕微注入装置が高価であるなどの問題点がある。

本発明の方法によれば、10万匹以上の精子へ一度に外来性DNAを導入でき、家畜のように、受精卵への外来性DNAの顕微注入が困難な場合には極めて有効である。また、外来性DNAを導入した多数の精子を凍結保存しておき、用時融解して人工受精あるいは体外受精を施すことによりトランスジェニック動物を容易に得ることができるので、産業上極めて有用である。

## 配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴： $\beta$ -gal遺伝子の4035から4055番目のヌクレオチドを認識するプライマー、MI499  $\beta$ -galと名付けた。

配列：

GACCGCTGGG ATCTGCCATT G

配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴： $\beta$ -gal遺伝子の4278から4298番目のヌクレオチドを認識するプライマー、MI500  $\beta$ -galと名付けた。

配列：

TACTGACGGG CTCCAGGAGT C

配列番号 : 3

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

起源 : なし

生物名 : なし

株名 : なし

配列の特徴 : neo遺伝子の1752から1767番目のヌクレオチドを認識する  
プライマー、MI1511 neoと名付けた。

配列 :

TCGTGGCTGG CCACGACGGG CGTTCC

配列番号 : 4

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

起源 : なし

生物名 : なし

株名 : なし

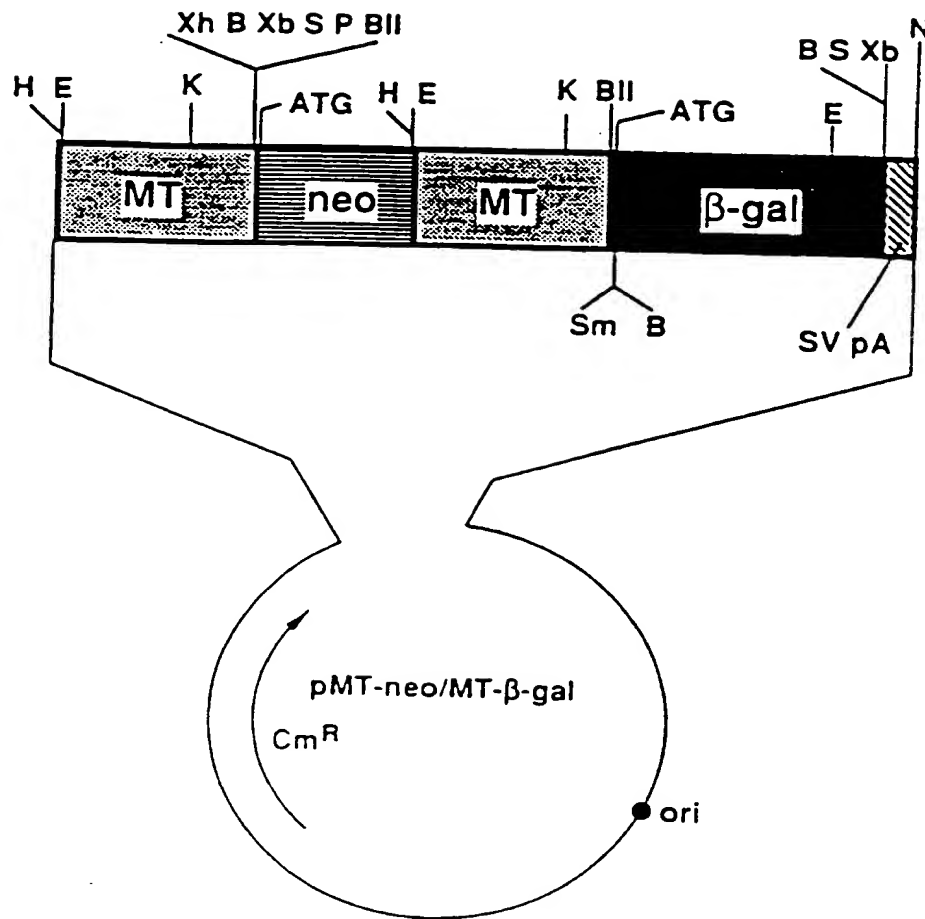
配列の特徴 : neo遺伝子の1846から1861番目のヌクレオチドを認識する  
プライマー、MI1512 neoと名付けた。

配列 :

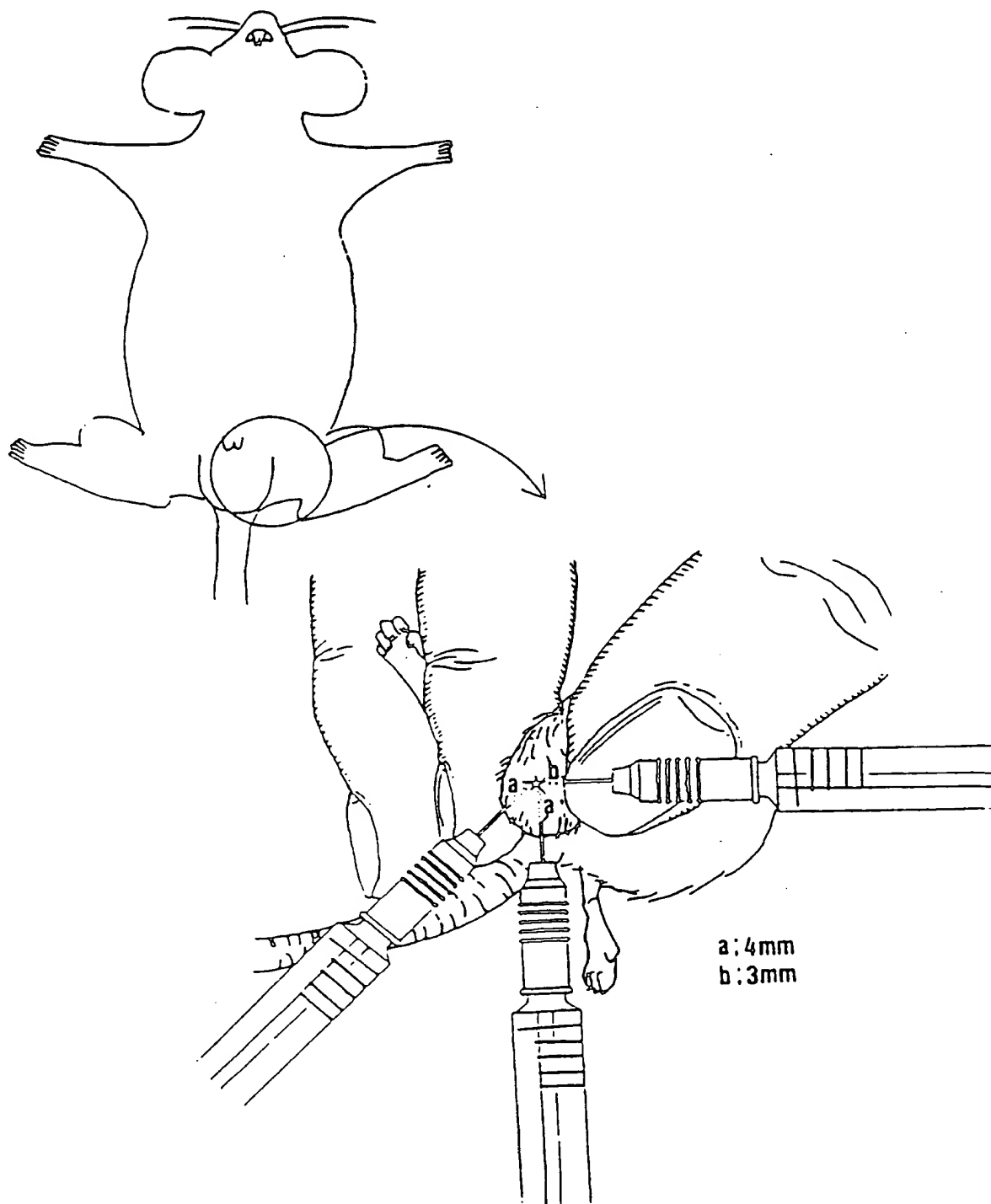
GACAGGAGAT CCTGCC

## 請 求 の 範 囲

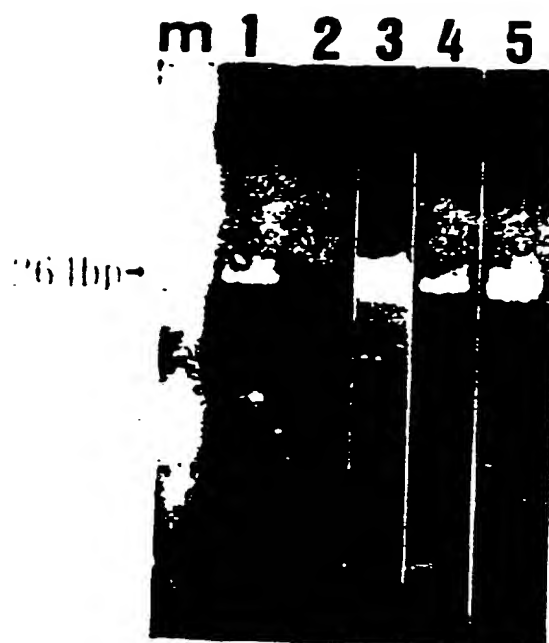
1. 非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リボソームに保持させた外来性DNAを注入し、該雄の精巣で外来性DNA導入精子を産生させることからなる、前記動物の外来性DNA導入精子の作成方法。
2. 雄精巣へのリボソームの注入が3回以上反復して行われる請求項1に記載の外来性DNA導入精子の作成方法。
3. 非ヒト脊椎動物がマウスである請求項1または2に記載の外来性DNA導入精子の作成方法。
4. 非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リボソームに保持させた外来性DNAを注入し、該雄の精巣で産生された外来性DNA導入精子を該脊椎動物の未受精卵と受精させることからなる、トランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法。
5. 非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リボソームに保持させた外来性DNAを注入して該雄の外来性DNA導入精子を産生させ、該雄動物を発情期の雌動物と交配させ、雌動物に妊娠、分娩させることからなる、トランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法。
6. 非ヒト脊椎動物の成熟雄の精巣に、遺伝子導入用リボソームに保持させた外来性DNAを注入して該雄の精巣で外来性DNA導入精子を産生させ、得られた外来性DNA導入精子を用いて人工受精または体外受精により雌動物に妊娠させ、分娩させることからなる、トランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法。
7. 雄精巣へのリボソームの注入が3回以上反復して行われる請求項4～6のいずれかの項に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法。
8. 非ヒト脊椎動物がマウスである請求項4～7のいずれかの項に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物の作成方法。



第 1 図



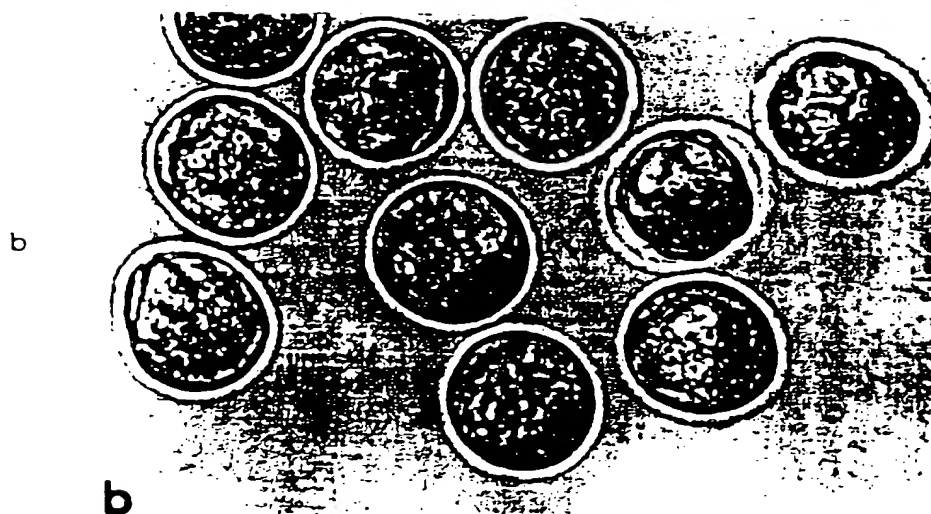
第 2 図



第 3 図

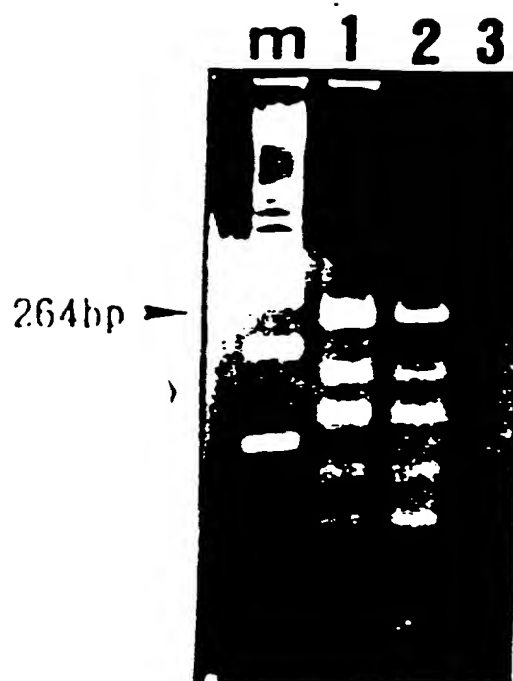


第 4 图

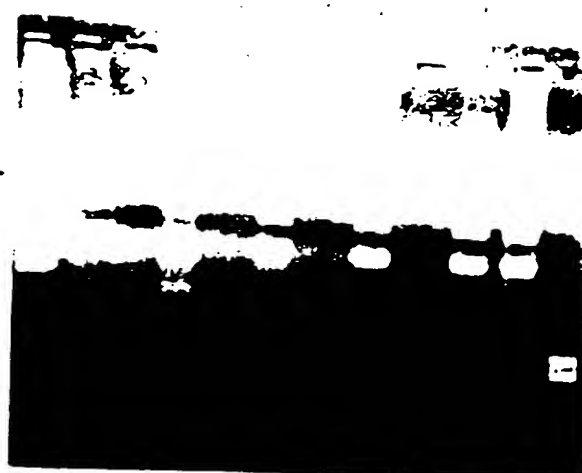


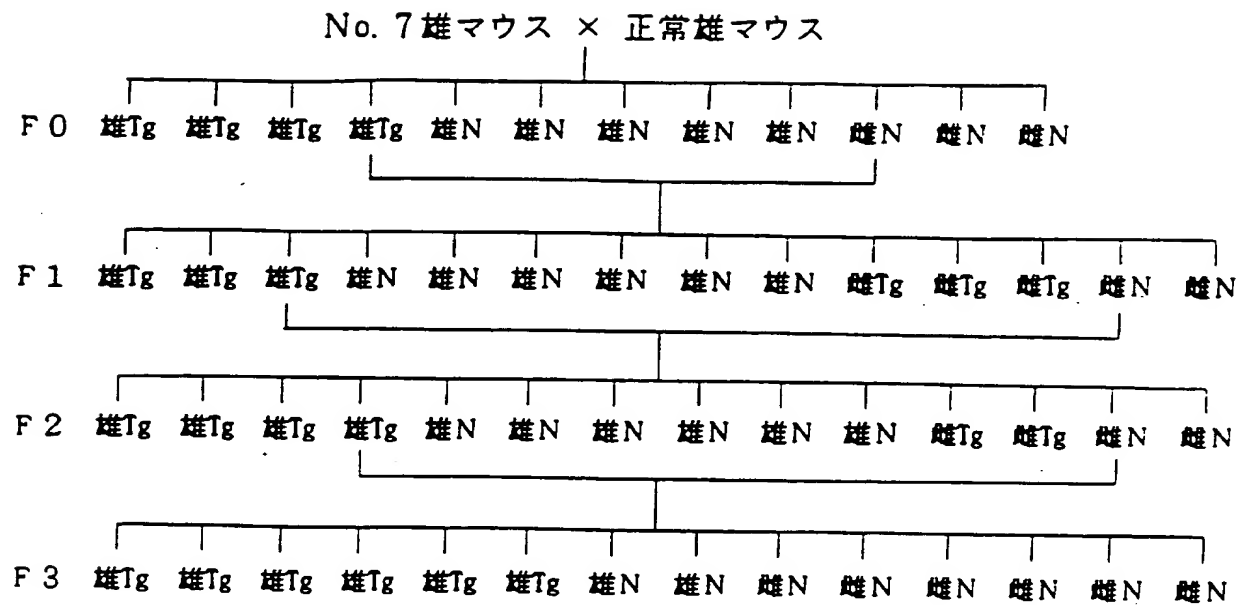
c

第 5 図



第 6 図





Tg=トランスジェニック個体

N=非トランスジェニック個体

## 第 7 図

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02828

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Animal Biotech. Vol. 5, No. 1 (1994), p. 19-31 especially p. 27, M. Sato et al. "Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer"	1 - 8
A	Science Vol. 261 (1993), p. 209-211, Zhu N. et al. "Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice"	1 - 8
A	Mol. Reprod. Dev. Vol. 30 (1993), p. 194-200, Bachiller D. et al. "Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells"	1 - 8
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86 (1989), p. 6982-6986, Behr J.P. et al. "Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA"	1 - 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
October 9, 1996 (09. 10. 96)Date of mailing of the international search report  
October 22, 1996 (22. 10. 96)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)